



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΣΟΛΟΒΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

**ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ
ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ
(hIGPb) ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *Escherichiacoli***

**OPTIMIZATION OF THE EXPRESSION OF THE HUMAN
LIVER GLYCOGEN PHOSPHORYLASE (hIGPb) USING
BACTERIA *Escherichia coli* AS THE EXPRESSION
SYSTEM**

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ (hIGPb) ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *Escherichia coli*

ΟΝΟΜΑ: ΣΟΛΟΒΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΚΑΜΝΑΚΗ: ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ
ΕΠΙΣΤΙΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ ΕΛΛΑΔΑ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ
ΕΠΙΣΤΙΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΦΥΤΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΙΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

*Αφιερώνεται στις ανιψιές μου,
τις μικρές Έλενα & Αλεξάνδρα Ράπτη*

“Sapere aude”

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση, την υποστήριξη και την υπομονή της καθ'όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Καθώς επίσης και τους καθηγητές μου Δρ. Δημήτρη Λεωνίδα και την Δρ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου, για την συνεργασία τους και την συνεισφορά τους στην ομαλή διεξαγωγή της παρούσας διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, για την άψογη συνεργασία τους και την επιστημονική και πνευματική υποστήριξη που μου παρείχαν. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Γεώργιο Στραβοδήμο που ήταν από την αρχή δίπλα μου, και χωρίς την επιστημονική, την πνευματική και ηθική υποστήριξή και την άψογη παρέα του, το εγχείρημα αυτό θα ήταν πολύ πιο δύσκολο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω πιο ειδικά τον υποψήφιο διδάκτορα Ευθύμιο Κυριάκη, ο οποίος βρισκόταν πάντα σε θέση, είτε ως καλός φίλος είτε ως συνάδελφος, να λύσει αμέτρητες απορίες και να διορθώσει καταστάσεις που δεν φαινότανουσαν ιδιαίτερα ευνοϊκές.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους υποψήφιους διδάκτορες Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου και Αθανάσιο Κυρίτση για την συμπαράστασή τους, τις συμβουλές τους και την άριστη παρέα τους. Για τα απαραίτητα χαλαρωτικά διαλείμματα και την ψυχολογική τους στήριξη θα ήθελα να ευχαριστήσω την φίλη μου και συνεργάτη υποψήφια διδάκτορα Ραφαηλία Μπέτα, τις φίλες μου Χαρά Ψαχούλα και Τασούλα Γκούσκου.

Ως ένδειξη ευγνωμοσύνης ευχαριστώ την οικογένειά μου, τα αδέρφια μου Βασιλική, Αλέξανδρο και Χρήστο, τη θεία μου Κατερίνα Σαμούρη και κυρίως τους γονείς μου Γεώργιο Σολοβό και Αλεξάνδρα Σαμούρη, που με στήριζαν σε κάθε βήμα, οικονομικά και ηθικά, και δεν με άφησαν ποτέ να να απογοητευτώ και να παρατήσω το στόχο μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καλούς μου φίλους, Γεωργία Λαμπρογιάννη, Δήμητρα Σακελλαρίου, Αλεξάνδρα Νάρη, Κωστή Γκριζιώτη, Μάριο Παπανικολάου, Δημήτριο Λειβαδιώτη, Μαργαρίτα Τσιρογιάννη, Διονυσία Βατσάκη, Ελένη Κατσιβελου, Ελευθερία Πίτσα, Βάγια Μηνά και Γεώργιο Σούλη για τις ατελείωτες ώρες γέλιου και για την ψυχική ανάταση που μου προσφέρουν εδώ και πολλά χρόνια.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	6
1. ABSTRACT.....	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1. Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών	12
1.1.1. Συστήματα έκφρασης	12
1.1.2. Το βακτήριο <i>Escherichia coli</i> ως σύστημα έκφρασης (πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα).....	13
1.1.3. Συχνότητα εμφάνισης κωδικονίων (codon usage).....	14
1.1.4. Έγκλειστα σωμάτια (inclusion bodies)	16
1.1.5. Τεχνολογία Ανασυνδυασμένου <i>DNA</i>	16
1.1.5.1. Φορείς κλωνοποίησης.....	17
1.1.5.2. Επαγωγή	21
1.1.6. Τρόποι βελτιστοποίησης ετερόλογης έκφρασης.....	23
1.1.6.1. Σειρές κυττάρων (cell strains)	24
1.1.6.2. Βελτιστοποίηση γονιδίου (optimization).....	24
1.1.6.3. Διαλυτότητα πρωτεϊνών	26
1.1.6.4. Συνέκφραση με Μοριακούς Συνοδούς.....	28
1.2. Φωσφορυλάση του Γλυκογόνου.....	30
1.2.1. Ηπατική Φωσφορυλάση του Γλυκογόνου	32
1.2.2. Ο Μεταβολισμός του Γλυκογόνου	36
1.2.3. Η ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση ως μοριακός φαρμακευτικός στόχος	38
1.2.4. Νόσοι σχετιζόμενοι με την αποθήκευση γλυκογόνου	39
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	41
3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	42
3.1. Υλικά	42
3.1.1. Αντιδραστήρια	42
Βακτηριακά στελέχη.....	44
3.1.1.1. Βακτηριακά στελέχη για την υπερέκφραση πρωτεϊνών	44

3.1.1.2.	Βακτηριακά στελέχη για κλωνοποίηση και υπερέκφραση πλασμιδιακών φορέων	45
3.2.	Μέθοδοι.....	53
3.2.1.	Παρασκευή επιδεκτικών προς χημικό μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων	53
3.2.2.	Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα (χημικός μετασχηματισμός)	54
3.2.3.	Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα (electroporation)	55
3.2.4.	Μελέτες έκφρασης της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (hIGPb)	56
3.2.4.1.	Υγρές καλλιέργειες	56
3.2.4.2.	Λύση κυττάρων	59
3.2.4.3.	Μεσαίας κλίμακας απομόνωση της ανασυνδυασμένης His-hIGPb με σφαιρίδια Ni-NTA Agarose.....	59
3.2.5.1.	Ηλεκτοφόρηση DNA	60
3.2.5.2.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	61
3.2.6.	Υπερέκφραση της hIGPb από τα κύτταρα BL21-Gold (DE3).....	64
3.2.7.	Λύση βακτηριακών κυττάρων	64
3.2.8.	Υγρή χρωματογραφία αγκιστείας (σύστημα FPLC).....	65
3.2.9.	Απομόνωση της hIGPb με στήλη αγκιστείας Ni ²⁺ σεφαρόζης	65
3.2.10.	Αφαίρεση σηματοδοτικής ετικέτας από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη His-hIGPb	66
3.2.11.	Χρωματογραφία ιονανταλλαγής	66
3.2.12.	Κινητικές μελέτες	69
3.2.13.	Βελτιστοποίηση γονιδίου	71
4.	Αποτελέσματα.....	72
4.1.	Ανάπτυξη κυττάρων	72
4.2.	Μελέτες έκφρασης της His-hIGPb	73
4.2.1.	Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (πλασμιδιακός φορέας pDEST-14).....	73
4.2.1.1.	Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (BL 21 Gold, B834/ 25°C,37°C)	73
4.2.1.2.	Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (BL 21 Gold, B834, B834plysS)	74

4.2.1.3.	Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο(BL 21 Gold/ - MnCl ₂ , 2.4mM MnCl ₂).....	75
4.2.1.4.	Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο(BL 21 Gold/ 18°C, 25°C, 37°C) 76	
4.2.1.5.	Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο(BL 21 Gold/ MnCl ₂ , MgCl ₂)	77
4.2.1.6.	Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο(BL21 Gold/ 2YT/ MnCl ₂ , MgCl ₂)	78
4.2.1.7.	Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (B834, B834plysS/ 2YT/ MnCl ₂ , MgCl ₂)	80
4.2.1.8.	Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (B834plysS/ LB Broth χειροποίητο)	82
4.2.1.9.	Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (BL 21 Gold/ 5mM, 10mM MgCl ₂)	83
4.2.1.10.	Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (Chaperones)....	84
4.2.1.11.	Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (Rosetta, Origami) 86	
4.2.3.	Μελέτες έκφρασης βελτιστοποιημένου γονιδίου (πλασμιδιακός φορέας pET-M11) 88	
4.2.3.1.	Μελέτες έκφρασης βελτιστοποιημένου γονιδίου(BL 21 Gold, B834/ 18°C, 37°C/ 0.0mM, 0.1mM, 0.5mM IPTG)	88
4.2.3.2.	Μελέτες έκφρασης βελτιστοποιημένου γονιδίου(+Glucose/-Glucose)..	89
4.2.3.3.	Μελέτες έκφρασης βελτιστοποιημένου γονιδίου(B834/ induction per hour) 90	
4.2.3.4.	Μελέτες έκφρασης βελτιστοποιημένου γονιδίου (Rosetta)	91
4.2.3.5.	Μελέτες έκφρασης βελτιστοποιημένου γονιδίου(Chaperones)	92
4.3.	Μελέτες βελτιστοποίησης διαλυτότητας hIGPb.....	94
4.3.1.	Μελέτες βελτιστοποίησης διαλυτότητας hIGPb στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο 94	
4.3.2.	Μελέτες βελτιστοποίησης διαλυτότητας hIGPb στο βελτιστοποιημένο γονίδιο 95	
4.4.	Καθαρισμός και απομόνωση της hIGPb.....	96
4.3.	96
4.5.	Κινητικές μελέτες hIGPb	101
5.	Συζήτηση.....	103
5.	Συζήτηση.....	103

6. Βιβλιογραφία	105
-----------------------	-----

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών, είναι απαραίτητη στη βιολογική έρευνα ώστε να μπορεί να μελετηθεί η δραστηριότητα ενός ενζύμου, ο τρόπος σύνδεσής του, η αλληλεπίδρασή του με άλλες πρωτεΐνες, καθώς και για άλλες λειτουργίες *in vitro*. Πολλές πρωτεΐνες αποτελούν επίσης πιθανούς φαρμακευτικούς στόχους[1],[2]. Η χρήση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών για δομικές μελέτες ή για φαρμακευτικούς λόγους, πολύ συχνά εμποδίζεται από τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης και από τη μη σωστή αναδίπλωση και συσσωμάτωση των πρωτεϊνών που μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της έκφρασης, του καθαρισμού, της αποθήκευσης ή της μεταφοράς στο απαραίτητο ρυθμιστικό διάλυμα[3]. Η παραγωγή πρωτεϊνών στη διαλυτή μορφή τους είναι σημαντική, όμως κατά την υπερέκφραση, το μεγαλύτερο ποσοστό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, εκφράζεται σε έγκλειστα σωμάτια[4]. Έτσι τα πλεονεκτήματα της *Escherichia coli* που αποτελεί το πιο συχνό και εύκολο σύστημα έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, μπορούν εύκολα να παραγκωνιστούν από τον σχηματισμό εσώκλειστων σωμάτων. Πολλά ετερόλογα πολυπεπίδια αδυνατούν να αναδιπλωθούν στην κανονική τους μορφή όταν εκφράζονται σε *Escherichia coli*. Η μη σωστή ανδίπλωση είναι ένα ιδιαίτερα δύσκολο πρόβλημα όσον αφορά την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών, ειδικά όταν αναφερόμαστε σε πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούνται από πολλαπλές υπομονάδες, έχουν αρκετούς δισουλφιδικούς δεσμούς ή περιέχουν πρόσθετες ομάδες[5]. Η ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (hIGP) καταλύει τη διάσπαση του γλυκογόνου σε 1-φωσφορική γλυκόζη, η οποία στη συνέχεια εισέρχεται στον κύκλο της γλυκόλυσης ώστε να καλύψει τις ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού[6]. Η συσχέτιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου με διάφορες ασθένειες καθιστούν την hIGP έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για την ανάπτυξη φαρμάκων για έναν αριθμό ασθενειών αλλά κυρίως για τον σακχαρώδη διαβήτη όπως επίσης και για τον καρκίνο[7]. Πρόκειται όμως για ένα μόριο μεγάλου μοριακού βάρους, της τάξεως των 97KDa, και στην προσπάθεια να εκφραστεί σε ετερόλογο σύστημα εμφανίζονται πολλαπλά προβλήματα. Με σκοπό η βιολογική της μελέτη να είναι πλήρης, απαιτείται να εκφραστεί πρωτεΐνη μεγάλης ποσότητας και υψηλής δραστηριότητας. Η αναγκαιότητα αυτή σε συνδυασμό με τα προβλήματα που εμφανίζονται, οδήγησε στο να ερευνηθούν διάφορες τεχνικές και να τροποποιηθούν οι συνθήκες έκφρασης. Δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες επαγωγής, χρησιμοποιήθηκαν πολλές κυτταρικές σειρές, μελετήθηκε η συνέκφραση της πρωτεΐνης στόχου με μοριακούς συνοδούς (chaperones) και τέλος εξετάστηκε συχνότητα εμφάνισης σπάνιων κωδικονίων στο γονίδιο της ετερόλογης πρωτεΐνης και βελτιστοποιήθηκαν. Τέλος πραγματοποιήθηκαν μελέτες διαφόρων συνθηκών με σκοπό να βελτιωθεί η διαλυτότητα και η σταθερότητα του ενζύμου.

ABSTRACT

Recombinant proteins are required in biological research to investigate enzyme activity, ligand binding, protein interactions or other functions in vitro. Many proteins are also potential pharmaceutical agents[1],[2]. The use of proteins for structural studies or as therapeutic agents is frequently hampered by low levels of expression, misfolding and protein aggregation during expression, purification, storage or transfer into requisite assay buffers[3]. Expression of soluble proteins is essential, however proteins frequently accumulate as insoluble aggregates (inclusion bodies)[4]. Formation of inclusion bodies is a considerable obstacle threatening the advantages of the E.coli expression system, that serves as the most common and easiest system in recombinant protein production. Many heterologous polypeptides fail to fold into their native state when expressed in *Escherichia coli*. Misfolding is a particularly vexing problem in the expression of recombinant proteins, especially those that are composed of multiple subunits, have several disulfide bonds, or contain prosthetic groups[5]. Human liver glycogen phosphorylase (hlGP) catalyzes the breakdown of glycogen to glucose-1-phosphate, which enters glycolysis to fulfill the energetic requirements of the organism[6]. The correlation of glycogen metabolism to many metabolic disorders has targeted hlGP for the development of drugs, for a number of metabolic diseases, predominantly diabetes mellitus but also cancer[7]. hlGP is a large molecule of 97KDa, therefore multiple problems occur when it comes to its heterologous expression. In order to achieve the full biological study of the protein, a great amount and high activity protein is required. This necessity along with the problems that arise, led to the optimization of the expression conditions. Various techniques were investigated and optimized. Many induction conditions were tested, a lot of different cell strains were used, co-expression of the recombinant target protein with molecular chaperones was attempted and finally the codon usage of the heterologous protein was examined and improved. Concurrently various conditions were examined in order to improve the protein solubility and stability.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών

Η βιολογική μελέτη των πρωτεϊνών, είτε για φαρμακευτικούς λόγους είτε για δομικές μελέτες που θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας τους, έχει δημιουργήσει την ανάγκη για εύρεση μεθόδων που θα μπορούν να αποδίδουν τις επιθυμητές πρωτεΐνες, σε μεγάλες ποσότητες και με υψηλή καθαρότητα. Αυτό, πλέον, επιτυγχάνεται μέσω της ετερόλογης έκφρασης. Ως ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών, καλείται η διαδικασία κατά την οποία γονίδια ενός οργανισμού εκφράζονται σε κάποιον άλλον οργανισμό. Αποτελεί κυρίως μία εμπειρική διαδικασία και υπάρχει ένα μεγάλο εύρος οργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα έκφρασης, μέσω της τεχνολογία του ανασυνδυασμένου *DNA*.

1.1.1. Συστήματα έκφρασης

Η έκφραση πρωτεϊνών αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την μελέτη ενδοκυτταρικών διεργασιών, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η επιλογή του καταλληλότερου συστήματος ετερόλογης έκφρασης, εξαρτάται απόλυτα από τον σκοπό της μελέτης[8]. Το εύρος επιλογής είναι μεγάλο. Το σύστημα έκφρασης μπορεί να είναι προκαρυωτικό, όπως για παράδειγμα το βακτήριο *Escherichia coli* ή ευκαρυωτικό όπως έντομα, ζύμες, ανασυνδυασμένα ζώα ή φυτά, ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών ακόμα και ιοί όπως οι βακιλοϊοί. Βασικό για τα συστήματα αυτά είναι ότι θα πρέπει να έχουν την ικανότητα να διατηρούν και να εκφράζουν το επιθυμητό γονίδιο. Κάθε ένα από αυτά έχει τα πλεονεκτήματά του και τα μειονεκτήματά του, καθώς επίσης και την αντίστοιχη τεχνολογία που θα τα υποστηρίξει.

Τα πιο γνωστά και καλά μελετημένα συστήματα είναι αυτό της *Escherichia coli* για τα βακτηριακά συστήματα, και για τις ζύμες το *Saccharomyces cerevisiae*. Η χρήση τους δεν απαιτεί ούτε πολύ ακριβή τεχνολογία, ούτε πολύ αυστηρές προδιαγραφές στην

μεταχείρισή τους και επίσης παρουσιάζουν απόδοση ετερόλογης έκφρασης σε υψηλά επίπεδα. Στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκε ως σύστημα, αυτό του βακτηρίου *Escherichia coli* καθώς ο σκοπός ήταν η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ομογενοποιημένων κυττάρων, ικανών να εκφράσουν την πρωτεΐνη στόχο για περαιτέρω μελέτες.

1.1.2. Το βακτήριο *Escherichia coli* ως σύστημα έκφρασης (πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα)

Τα βακτηριακά συστήματα χρησιμοποιούνται συχνά για την έκφραση ετερόλογων γονιδίων τόσο προκαρυωτικής όσο και ευκαρυωτικής προέλευσης. Συνήθως ως βακτηριακό σύστημα επιλέγεται το Gram-αρνητικό βακτήριο *Escherichia coli* όπου τα πλεονεκτήματα της χρήσης του περιλαμβάνουν την ευκολία στην ανάπτυξη και διαχείριση αυτού του οργανισμού με τη χρήση απλού εργαστηριακού εξοπλισμού, την διαθεσιμότητα και μεγάλη ποικιλία φορέων κλωνοποίησης και ειδικών «σειρών» κυττάρων (*strains*) που έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την μεγιστοποίηση της έκφρασης, τον πλούτο πληροφοριών τόσο για τη γενετική όσο και για τη φυσιολογία αυτού του βακτηρίου και τέλος την επιρροή γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών[9].

Η έκφραση μπορεί να επιτευχθεί σε σχετικά γρήγορο χρονικό διάστημα. Επιλέγοντας έναν ευκαρυωτικό κλώνο από μία βιβλιοθήκη *cDNA* και ακολουθώντας πρωτόκολλο λίγων ημερών είναι δυνατό να επιτύχουμε υπερέκφραση της πρωτεΐνης και απομόνωσή της σε ποσότητες αρκετών mg. Καλλιέργειες υπό ανακίνηση μπορούν να παράγουν πολλά mg ετερόλογης πρωτεΐνης ανά λίτρο καλλιέργειας. Με τη χρήση βιοαντιδραστήρων όπου μπορεί να επιτευχθεί υψηλή πυκνότητα κυττάρων είναι δυνατόν να παραχθεί πάνω από g ανά λίτρο, της πρωτεΐνης.

Με τη χρήση ειδικών κυτταρικών σειρών (*strains*) η έκφραση του ίδιου του συστήματος ελαχιστοποιείται και η ποσότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μπορεί να φτάσει το 50% του συνόλου των παραγόμενων μακρομορίων. Η χρήση της επιθυμητής πρωτεΐνης παίζει σημαντικό ρόλο στην επιλογή της *Escherichia coli* ως το σύστημα έκφρασής μας. Γενικά είναι η πρώτη επιλογή σε περιπτώσεις που δεν χρειαζόμαστε την πρωτεΐνη σε φυσική διαμόρφωση (*native conformation*) όπως στην περίπτωση που την χρειαζόμαστε για την παραγωγή ανοσογόνου με σκοπό την δημιουργία αντιορού που θα χρησιμοποιηθεί αργότερα σε Western blot. Όταν θέλουμε να εκφράσουμε μία πρωτεΐνη σε φυσική διαμόρφωση και δραστικότητα σε αυτό το σύστημα η επιτυχία είναι πιο πιθανή όταν το μέγεθός της είναι σχετικά μικρό, της τάξεως των 70 kDa. Επίσης είναι ιδανικό σαν σύστημα

όταν δεν υπάρχουν ελεύθερες κυστεΐνες ή περισσότεροι από 3 ή 4 ενδομοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί, και δεν απαιτούνται μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις για την ενεργότητα και την διαλυτότητα[10]. Βέβαια η επιλογή του βακτηρίου *Escherichia coli* ως σύστημα έκφρασης μπορεί να εμφανίσει αρκετά προβλήματα με αποτέλεσμα η επιλογή κάποιου άλλου συστήματος, όπως αυτά που βασίζονται σε ζύμες, έντομα ή ευκαρυωτικά κύτταρα να αποδίδουν καλύτερα.

Το πιο σημαντικό εμπόδιο είναι η ανικανότητα της *Escherichia coli* να εκτελεί πολύπλοκες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις τυπικές για τους ευκαρυώτες, όπως α) γλυκοζυλίωση, β) φωσφορυλίωση, γ) ειδικές πρωτεολυτικές επεξεργασίες κ.α.[11] Άλλο σημαντικό όριο στη χρήση αυτού του συστήματος είναι η μειωμένη ικανότητα να φέρει εις πέρας την δημιουργία εκτενών δισουλφιδικών δεσμών και την επανασυναρμολόγηση της ετερόλογης πρωτεΐνης από πολλές υπομονάδες. Επίσης μπορεί να χρειαστεί κάποια προσπάθεια ώστε να ξεπεραστεί το γεγονός ότι πολλές φορές υπάρχουν πρωτεΐνες οι οποίες εκφράζονται στην αδιάλυτη μορφή τους ως συνέπεια κακής αναδίπλωσης, δημιουργία συσσωματωμάτων και έγκλειστων σωμάτων (inclusion bodies)[12]. Αρκετές φορές είναι δύσκολη και η παραγωγή της πρωτεΐνης με το αυθεντικό αμινοτελικό της άκρο, δηλαδή η παρουσία ή η απουσία Μεθειονίνης (Met) στο N-τελικό άκρο του πολυπεπτιδίου όπως είναι η αρχική προέλευση των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών.

1.1.3. Συχνότητα εμφάνισης κωδικονίων (codon usage).

Η επίτευξη της υπερέκφρασης μπορεί να είναι δύσκολη λόγω προβλημάτων όπως η αποδόμηση της πρωτεΐνης ή λόγω ανεπαρκούς μετάφρασης που οφείλεται σε δομικά χαρακτηριστικά του *mRNA* και στην ανικανότητα του βακτηρίου να 'διαβάσει' κάποιες συγκεκριμένες τριπλέτες των ευκαρυωτών[13]. Εάν εξετάσουμε την συχνότητα εμφάνισης των κωδικονίων (codon usage) βλέπουμε ότι δεν χρησιμοποιούνται όλες οι τριπλέτες *mRNA* στην ίδια ποσότητα και αυτό είναι κάτι που εξαρτάται απόλυτα από τη φύση του κάθε οργανισμού. Υπάρχουν τα επονομαζόμενα κύρια κωδικώνια που απαντώνται σε πρωτεΐνες με υψηλά επίπεδα έκφρασης αλλά υπάρχουν και τα 'σπάνια' κωδικώνια (rare codons) που τα συναντάμε σε γονίδια που έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης[14].

Συνήθως η συχνότητα εμφάνισης των κωδικονίων αντανάκλα την αφθονία των αντίστοιχων *tRNAs*. Για αυτό το λόγο όταν τα κωδικώνια της πρωτεΐνης που στοχεύουμε περιέχουν σε μεγάλο ποσοστό τριπλέτες που δεν χρησιμοποιούνται συχνά από το σύστημα έκφρασης που έχουμε επιλέξει, τότε οδηγούμαστε σε προβλήματα στην έκφραση. Τα

προβλήματα αυτά μπορούν να εξηγηθούν ως μειωμένη σταθερότητα του *mRNA* (καθυστερώντας τη μετάφραση), ως πρώιμο τερματισμό της μεταγραφής ή/και της μετάφρασης που έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ποικιλίας προϊόντων πρωτεϊνών με ελλιπή κομμάτια (truncated), ως μετατοπίσεις αναγνωστικών πλαισίων, διαγραφές και λανθασμένες ενσωματώσεις (π.χ. λυσίνη αντί αργινίνης), και τέλος ως αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης και της ανάπτυξης των κυττάρων.

Οι τριπλέτες των κωδικονίων που δεν χρησιμοποιούνται συχνά από την *Escherichia coli* παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 1 [15]

AGG	Arginine
AGA	
CGG	
CGA	
GGA	Glycine
AUA	Isoleucine
CUA	Leucine
CCC	Proline

Όταν το επιθυμητό γονίδιο περιέχει μεγάλο ποσοστό αυτών των κωδικονίων τότε το βακτήριο αδυνατεί να τα διαβάσει, δηλαδή τα προσπερνάει, έχοντας σαν αποτέλεσμα κατά την έκφραση του γονιδίου να υπάρξουν κάποια από τα παραπάνω προβλήματα και άρα η παραγωγή της πρωτεΐνης να είναι σε πολύ μικρά επίπεδα έως και μηδενικά. Ακόμα εντονότερο είναι το πρόβλημα όταν τα κωδικόνια αυτά βρίσκονται κοντά στο 5'-τελικό άκρο του *mRNA* ή σε συμπλέγματα, γιατί αυξάνεται η πιθανότητα για truncated προϊόντα και η έκφραση πέφτει σε χαμηλά επίπεδα[16].

Δυστυχώς αυτά τα προβλήματα, είτε μεμονωμένα είτε συνδυαστικά, μπορούν να δυσκολέψουν αρκετά την έρευνα μας και κάτι που φαινομενικά είναι εφικτό και εύκολο να καταλήξει με αρκετά εμπόδια για την εξέλιξη του πειράματος. Από τον τεράστιο αριθμό των πρωτεϊνών που έχουν εκφραστεί ετερόλογα με τη χρήση της *Escherichia coli*, μόνο το 30%

του συνόλου εκφράζεται σε διαλυτή μορφή[17] ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό εκφράζεται υπό τη μορφή αδιάλυτων έγκλειστων σωματίων (inclusion bodies).

1.1.4. Έγκλειστα σωματίδια (inclusion bodies)

Τα έγκλειστα σωματίδια είναι μη κρυσταλλικές άμορφες δομές. Ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί στην αρχική τους κατάσταση να έχουν κάποια δευτεροταγή δομή[18]. Προκύπτουν από λανθασμένη αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας ως συνέπεια του γεγονότος ότι στους προκαρυωτικούς οργανισμούς η αναδίπλωση ολοκληρώνεται μετά το πέρας της μετάφρασης ενώ στους ευκαρυωτικούς η αλυσίδα αναδιπλώνεται παράλληλα επιτρέποντας έτσι τη διαδοχική αναδίπλωση των ξεχωριστών δομικών περιοχών και την παραγωγή ενός ορθά διπλωμένου μακρομορίου[19]. Ο σχηματισμός τους μπορεί να σχετιστεί και με το γεγονός ότι κάποιες αναδιπλωμένες υπομονάδες μπορούν να δημιουργούν συμπληρωματικές περιοχές πρόσδεσης με τέτοιο τρόπο, ώστε να προωθείται η δημιουργία συσσωματωμάτων[20]. Έγκλειστα σωματίδια μπορούν επίσης να σχηματιστούν και από την γενικότερη αλλαγή του εσωτερικού μικροπεριβάλλοντος στο οποίο εκφράζεται η πρωτεΐνη. Αφού το γονίδιο δεν εκφράζεται στο αυθεντικό του αρχικό περιβάλλον μία οποιαδήποτε αλλαγή όπως π.χ. στο *pH* ή στην ωσμωτική πίεση μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία συσσωματωμάτων καθώς περιοχές που ήταν αρχικά υδρόφοβες και άρα καλά προστατευμένες μπορούν κατά την ετερόλογη έκφραση να βρεθούν εκτεθειμένες και σε θέση να αλληλεπιδρούν με άλλες παρόμοιες περιοχές.

Όλα τα παραπάνω εμπόδια είναι απαραίτητο να λυθούν και πρόσφατες πρόοδοι στην βασική κατανόηση των μηχανισμών αντιγραφής/μετάφρασης και αναδίπλωσης των πρωτεϊνών στην *E.coli* σε συνδυασμό με την ποικιλία των βελτιωμένων μοριακών εργαλείων διευκολύνουν κατά πολύ το έργο μας. Για το κάθε πρόβλημα υπάρχει και η ανάλογη προσέγγιση που θα εξομαλύνει τις διαφορές ανάμεσα στα δύο συστήματα, το σύστημα έκφρασης και το σύστημα από το οποίο προέρχεται η επιθυμητή πρωτεΐνη, καλυτερεύοντας κατά πολύ την απόδοση της έκφρασης σε σημείο που να αγγίζει την πολυπόθητη υπερέκφραση.

1.1.5. Τεχνολογία Ανασυνδυασμένου DNA

Βάση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA αποτελεί η μοριακή κλωνοποίηση. Ως μοριακή κλωνοποίηση χαρακτηρίζεται η διαδικασία κατά την οποία, ανασυνδυασμένα

μόρια παράγονται και μετασχηματίζονται σε έναν οργανισμό ξενιστή, όπου και αντιγράφονται. Μία τυπική τεχνική μοριακής κλωνοποίησης περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό του προς μελέτη γονιδίου και την ενσωμάτωσή του σε κάποιον φορέα κλωνοποίησης που θα είναι ικανός να το αντιγράψει[21]. Το επιθυμητό γονίδιο έχει προηγουμένως προσδιοριστεί αμινοξικά και έχει σχεδιαστεί ένας ολιγονουκλεοτιδικός ανιχνευτής ο οποίος με τη χρήση κατάλληλης βιβλιοθήκης *DNA* (*cDNA*) μας δίνει την ταυτοποίησή του και εν συνεχεία εισάγεται σε έναν φορέα κλωνοποίησης.

1.1.5.1. Φορείς κλωνοποίησης

Είναι ένα γενετικό στοιχείο που χρησιμοποιείται για να δέχεται και να μεταφέρει τμήματα *DNA* (ένθεμα) και βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή, ώστε η έκφραση του να μπορεί να ρυθμιστεί με την προσθήκη κάποιου επαγωγέα ή με κάποια αλλαγή στο θρεπτικό μέσο. Η επιλογή του σωστού φορέα κλωνοποίησης, ώστε να ταιριάζει καλύτερα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε πρωτεΐνης, είναι ιδιαίτερα σημαντικό βήμα στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου *DNA*. Σκοπός του φορέα είναι να απομονώσει, πολλαπλασιάσει και εκφράσει το εισαγόμενο γονίδιο. Συνήθως ως φορείς κλωνοποίησης προτιμούνται βακτηριοφάγοι ή πλασμίδια.

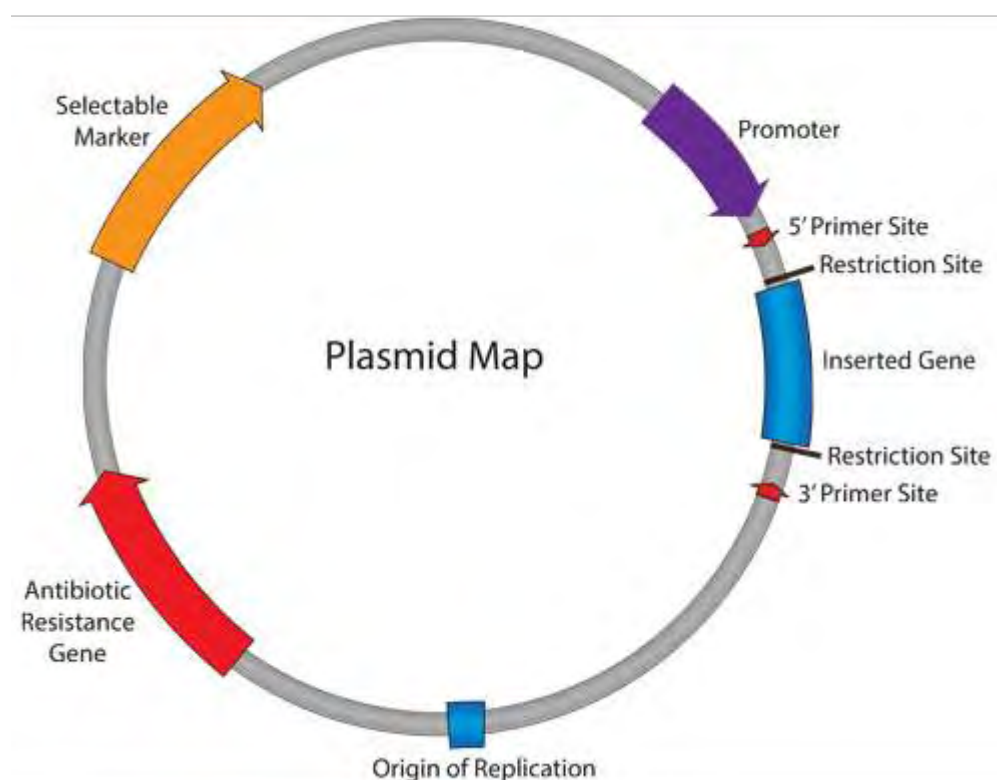
Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά τμήματα *DNA*, τα οποία αντιγράφονται μέσα στον ξενιστή και η ύπαρξή τους είναι ανεξάρτητη από το χρωμοσωμικό ή γενωμικό *DNA* του ξενιστή[22]. Τα πλασμίδια λοιπόν ως φορείς είναι ιδανικά και επιλέγονται πολύ συχνά καθώς έχουν μικρό μέγεθος, δίνουν μεγάλο αριθμό αντιγράφων, έχουν πολλές θέσεις να δράσουν τα ένζυμα περιορισμού και τέλος περιέχουν επιλέξιμους δείκτες (κυρίως ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά) που καθιστούν εύκολο τον προσδιορισμό των κλώνων που περιέχουν το γονίδιο. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται στην έκφραση διακρίνονται από κάποια ειδικά χαρακτηριστικά όπως είναι η περιοχή της αντιγραφής, ο υποκινητής, η περιοχή κλωνοποίησης, το γονίδιο που θα προσδίδει κάποια ιδιότητα στο πλασμίδιο καθιστώντας το επιλέξιμο σε σύγκριση με τα άλλα, κάποιος μοριακός δείκτης και τέλος η εισαγωγή κάποιας ετικέτας στην παραγόμενη πρωτεΐνη που θα βοηθάει στην απομόνωση και τον καθαρισμό της. Το γονίδιο εισάγεται στην ειδική περιοχή που ονομάζεται πολυσυνδέτης (*multiple cloning site, MCS*), η οποία περιέχει μεγάλο αριθμό περιοριστικών θέσεων επιτρέποντας έτσι την εισαγωγή του γονιδίου μετά από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Εικόνα 1). Μεταξύ των γονιδίων που περιέχονται στα πλασμίδια

υπάρχουν και τα γονίδια που σχετίζονται με τη μεταφορά γενετικού υλικού από ένα βακτήριο σε άλλο.

Ο υποκινητής είναι απαραίτητος να υπάρχει μπροστά από τα γονίδια που έχουμε εισάγει, όπως αυτά που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά ή το γονίδιο της πρωτεΐνης στόχου, καθώς καθοδηγεί στην ουσία την μεταγραφή του ξένου *DNA* και επιτρέπεται έτσι η έκφραση των προϊόντων. Οι πιο συνηθισμένοι υποκινητές που χρησιμοποιούνται είναι βασισμένοι στις αλληλουχίες υποκινητών του *lac operon* και του *T7* βακτηριοφάγου. Το *lac* οπερόνιο συμμετέχει στην μεταφορά και στον μεταβολισμό της λακτόζης από την *E.coli* και φυσιολογικά ρυθμίζεται από τον *lac operator* ώστε η έκφραση να συμβαίνει μόνο όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο κύτταρο είναι περιορισμένα αλλά υπάρχει λακτόζη[23]. Τα πλασμίδια λοιπόν περιέχουν ένα γονίδιο *lac*, συνήθως το *lacI*, που κωδικοποιεί τον καταστολέα του *lac* οπερονίου. Όταν το οπερόνιο δεν είναι μπλοκαρισμένο αναγνωρίζεται από την *RNA* πολυμεράση και επιτρέπει την συνέχιση της μεταγραφής στο ακολουθούμενο γονίδιο. Ο *T7* υποκινητής χρησιμοποιείται ευρέως καθώς έχει υψηλή συγγένεια με την *T7 RNA* πολυμεράση προωθώντας έτσι την μεταγραφή και άρα και την έκφραση του ζητούμενου γονιδίου. Οπότε για να είναι επιτυχής η μεταγραφή του γονιδίου μας θα πρέπει πρώτα ο καταστολέας να φύγει μπροστά από την περιοχή χειριστή του *DNA* (*operator sequence*) και να μεταφερθεί μπροστά από το γονίδιο στόχο ώστε η *T7 RNA* πολυμεράση να καταφέρει να αναγνωρίσει την αλληλουχία του *T7* υποκινητή.

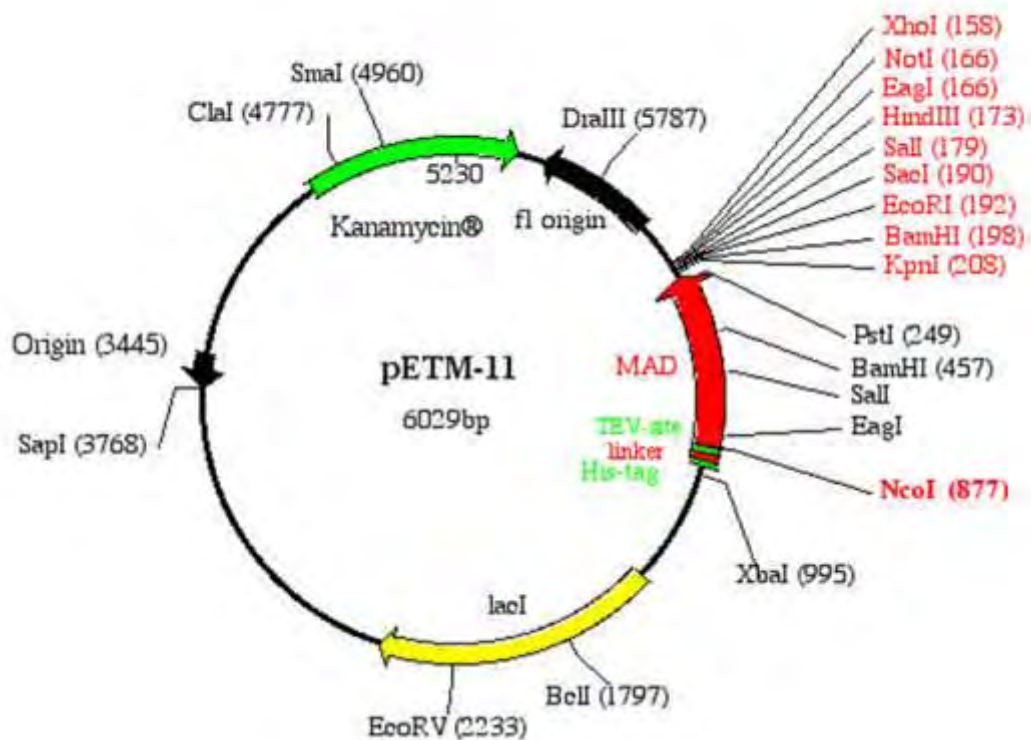
Η περιοχή της αντιγραφής είναι απαραίτητη γιατί αυτή είναι που επιτρέπει την αντιγραφή του φορέα και την συντήρησή του μέσα στο κύτταρο-ξενιστή. Σημαντική είναι και η περιοχή κλωνοποίησης, αφού είναι το σημείο στο οποίο επιτρέπεται και πραγματοποιείται η εισαγωγή των εξωγενούς *DNA*. Όταν μιλάμε για την περιοχή κλωνοποίησης μπορεί να αναφερόμαστε σε μεμονωμένη ή και σε πολλαπλή περιοχή. Οι περισσότεροι φορείς επίσης περιέχουν γονίδια που βοηθάνε στο διαχωρισμό τους. Τέτοια γονίδια μπορούν να προσδίδουν ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένο αντιβιοτικό, ή και μπορούν να λειτουργούν ως μοριακοί δείκτες που βοηθάν στην ανίχνευση των επιτυχώς κλωνοποιημένων γονιδίων όπως για παράδειγμα η λουσιφεράση ή το γονίδιο της *GFP* (*green fluorescent protein*). Τέλος πολλά πλασμίδια έκφρασης περιέχουν κάποιες πρωτεΐνες ή πεπτιδικές ακολουθίες που εισάγουν ετικέτες στο επιθυμητό προϊόν και διευκολύνουν τον καθαρισμό του[24]. Τέτοιες ετικέτες είναι για παράδειγμα η «ουρά» Ιστιδίνης (*His-tag*), ή η *S* τρανσφεράση της γλουταθειόνης (*GST's*). Η επιθυμητή μας πρωτεΐνη είναι προσκολλημένη σε αυτές τις ετικέτες αλλά υπάρχει ανάμεσά τους μία περιοχή στην οποία μπορούν και δρουν οι πρωτεάσες και έτσι μπορεί αργότερα η ετικέτα να απομακρυνθεί.

Έτσι και στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης με «ουρά» Ιστιδίνης (His-tag) που προσδίδουν στο άκρο της παραγόμενης πρωτεΐνης μία σειρά από έξι Ιστιδίνες οι οποίες της επιτρέπουν να δεσμευθεί σε ακινητοποιημένα μεταλλικά ιόντα Ni ή Co, βήμα απαραίτητο για τη διαδικασία της απομόνωσης.



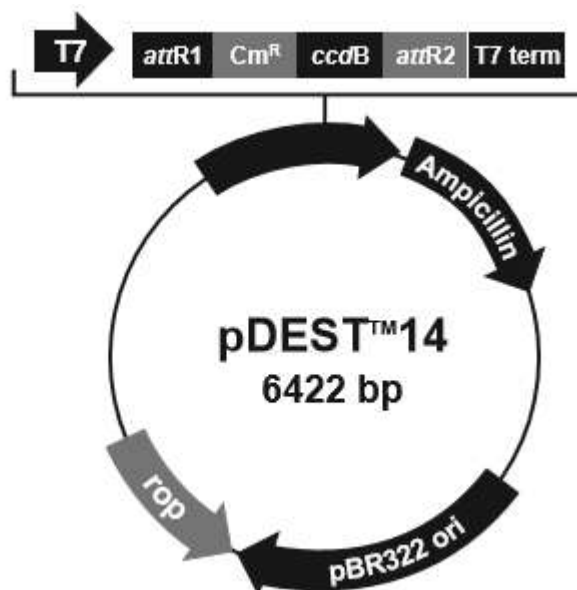
Εικόνα 1: Ένας χαρακτηριστικός πλασμιδιακός χάρτης στον οποίο εμφανίζονται οι περιοχές που καθιστούν το πλασμίδιο ιδανικό ως φορέα[25].

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται στη γενετική μηχανική ονομάζονται φορείς (*vectors*) και είναι εμπορικά διαθέσιμα από διάφορους κατασκευαστές. Τα συστήματα *pET* έχουν σχεδιαστεί για την κλωνοποίηση και έκφραση ανασυνδυασμένων γονιδίων σε κύτταρα του στελέχους *E.coli*, με αποτέλεσμα, όταν ενεργοποιηθεί, να είναι δυνατή η γρήγορη παραγωγή μεγάλης ποσότητας οποιασδήποτε επιθυμητής πρωτεΐνης. Στο σχήμα που ακολουθεί (Εικόνα 2) φαίνεται ο πλασμιδιακός χάρτης του χρησιμοποιούμενου φορέα έκφρασης για έκφραση του *cDNA* και παραγωγή της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος από ανασυνδυασμένα βακτήρια.



Εικόνα 2: Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα *pET-M11*. Απεικονίζεται η περιοχή του πολυσυνδέτη, η ανθεκτικότητα σε καναμυκίνη και η περιοχή που αναγνωρίζει και δρα η πρωτεάση TEV[26].

Τα συστήματα *pDEST* εμπίπτουν στην τεχνολογία *Gateway*[®] και είναι κατασκευασμένα για χρήση σε ετερόλογη έκφραση τόσο σε *E.coli*, όσο και σε έντομα, ζύμες ή και σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Περιέχουν θέσεις *attR* για ανασυνδυασμό με οποιαδήποτε *attL*-περιοχή (Εικόνα 3).



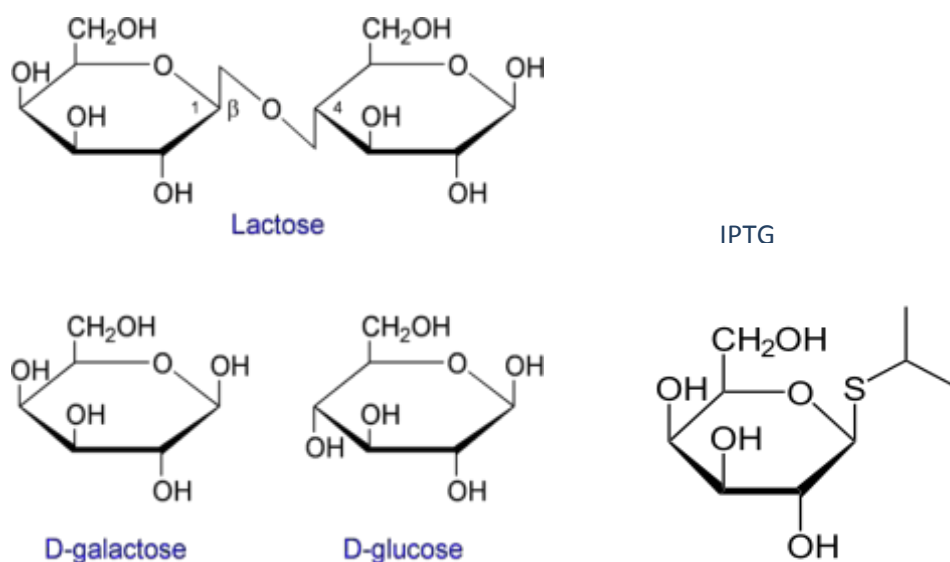
Εικόνα 3: Πλασμιδιακός χάρτης του συστήματος *pDEST-14*. Απεικονίζεται η περιοχή του πολυσυνδέτη, η ανθεκτικότητα σε *ampicillin* και *chloramphenicol* καθώς και οι περιοχές *attR*[27].

1.1.5.2. Επαγωγή

Η διαδικασία της επαγωγής βασίζεται στο ότι κατά την απουσία λακτόζης, ο *Lac* καταστολέας προσδένεται στην περιοχή χειρισμού του *DNA* κάμπτοντας το *DNA* κατά κάποιους βαθμούς μπλοκάροντας έτσι την πρόσβαση στην *T7 RNA* πολυμεράση στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου μας, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η μεταγραφή. Όταν όμως η λακτόζη είναι παρούσα, δένεται στο γονίδιο *LacI* και επάγει μια διαμορφωτική αλλαγή στην πρωτεϊνική δομή του καταστολέα καθιστώντας τον ανίκανο να προσδεθεί στην περιοχή χειρισμού του *DNA* επιτρέποντας την συνέχιση της μεταγραφής του γονιδίου[28]. Ουσιαστικά ο επαγωγέας αντικαθιστά τη λακτόζη και προωθεί την έκφραση της πρωτεΐνης στόχου.

Είναι ένα μόριο που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων και λειτουργεί με το να προσδένεται σε καταστολείς ή σε ενεργοποιητές[29]. Όταν προσδεθεί στον καταστολέα τον απενεργοποιεί καθώς έτσι τον εμποδίζει να συνδεθεί με την περιοχή χειριστή του *DNA* και η *RNA* πολυμεράση είναι πλέον ελεύθερη να μεταγράψει το γονίδιο. Αρκετές φορές μπορεί να προσδένεται σε ενεργοποιητές, οι οποίοι γενικότερα συνδέονται αδύναμα με αλληλουχίες ενεργοποίησης του *DNA*, με αποτέλεσμα το σχηματιζόμενο σύμπλοκο ενεργοποιητής-επαγωγέας να δίνει ισχυρά σε αυτές τις αλληλουχίες ενεργοποίησης και ενεργοποιεί την μεταγραφή του γονιδίου στόχου[30].

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ουσιών που είναι παράγωγα ή ανάλογα της λακτόζης και μπορούν να δουλέψουν ικανοποιητικά με το *lac* οπερόνιο. Καθώς η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης που απαρτίζεται από ένα μόριο D-γαλακτόζης και D-γλυκόζης, τα μόρια αυτά που δρουν ως επαγωγείς είναι στην ουσία υποκατεστημένες γαλακτοσιδάσες όπου το τμήμα της γλυκόζης στο μόριο της λακτόζης έχει αντικατασταθεί από κάποια άλλη χημική ομάδα. Έτσι και το βασικότερο μόριο που χρησιμοποιείται ως επαγωγέας είναι η ισοπροπυλο-β-D-θειογλυκοκυρανόζη, αλλιώς γνωστό ως *IPTG*, στο οποίο η ομάδα της γλυκόζης έχει υποκατασταθεί με την ομάδα $CH_3CH(S)CH_3$. Η επαγωγή που προκαλεί το *IPTG* στηρίζεται στο ότι είναι δομικά παραπλήσιο με το μόριο της λακτόζης (Εικόνα 4), οπότε μπορεί και αυτό να προσδένεται ισχυρά στον καταστολέα του *lac* οπερονίου προκαλώντας κάποια διαμορφωτική αλλαγή η οποία μειώνει την συγγένεια του καταστολέα με την περιοχή χειριστή του *DNA*. Το *IPTG* σε αντίθεση με τη λακτόζη δεν αποτελεί κομμάτι κάποιου μεταβολικού μονοπατιού των κυττάρων και έτσι δεν θα διασπαστεί ή χρησιμοποιηθεί από το κύτταρο. Αυτό του προσδίδει το κύριο πλεονέκτημά του έναντι της λακτόζης και το καθιστά πιο χρήσιμο ως επαγωγέα για το *lac* οπερόνιο, καθώς η συγκέντρωσή του θα παραμένει σταθερή καθ'όλη τη διάρκεια της έκφρασης[31]. Το άτομο του Θείου (S) του παρέχει αυτό το πλεονέκτημα, καθώς δημιουργεί χημικούς δεσμούς που δεν μπορούν να υδρολυθούν από το κύτταρο και έτσι η σταθερή συγκέντρωσή του, μας παρέχει την ασφάλεια ότι η έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζονται από το *lac* οπερόνιο δεν θα καταστέλλεται καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος.



Εικόνα 4: Η δομή της λακτόζης σε σύγκριση με την δομή του επαγωγέα *IPTG*. Το *IPTG* αποτελείται από το μόριο της γαλακτόζης όπως και η λακτόζη αλλά διαφέρουν στο μόριο της γλυκόζης που έχει αντικατασταθεί από την χημική ομάδα $CH_3CH(S)CH_3$. Χάρη στη γαλακτόζη μπορεί να συνδεθεί στον *lac* καταστολέα και να επάγει την μεταγραφή του γονιδίου και χάρη στην υποκατεστημένη χημική ομάδα δεν συμμετέχει στον μεταβολισμό της λακτόζης και έτσι η συγκέντρωσή του παραμένει σταθερή[32].

Εφ'όσον λοιπόν ο καταστολέας δεν μπορεί πλέον να συνδεθεί στον χειριστή, η ενδογενής *RNA* πολυμεράση ξεκινάει να μεταγράφει σε υψηλά επίπεδα το γονίδιο της *T7 RNA* πολυμεράσης που έχουμε εισάγει στο γονιδίωμα. Όταν η *T7 RNA* πολυμεράση έχει εκφραστεί δένει στην αλληλουχία του *T7* υποκινητή που βρίσκεται άνωθεν του γονιδίου ενδιαφέροντος που έχουμε ενθέσει και καταλήγει να το μεταγράφει. Μέσω της επαγωγής πολύ σύντομα το προϊόν που επιθυμούμε, η ζητούμενη πρωτεΐνη, έχει εκφραστεί σε μεγάλες ποσότητες καταλαμβάνοντας το μεγαλύτερο ποσοστό του συνόλου των εκφραζόμενων πρωτεϊνών του κυττάρου, και έτσι μπορούμε να μιλάμε για υπερέκφραση.

1.1.6. Τρόποι βελτιστοποίησης ετερόλογης έκφρασης

Για την βελτιστοποίηση της ετερόλογης έκφρασης με το σύστημα της *E.coli*, και για να επιτευχθεί η ζητούμενη υπερέκφραση, υπάρχουν κάποια στάδια στα οποία πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία και να πραγματοποιηθούν οι απαραίτητες δοκιμές και τελικά αλλαγές.

1.1.6.1. Σειρές κυττάρων (cell strains)

Για την ετερόλογη έκφραση σε *E. coli* υπάρχουν ειδικές κυτταρικές σειρές (*strains*) διαθέσιμες στο εμπόριο, οι οποίες είναι σχεδιασμένες να μπορούν να κωδικοποιούν κάποιες από τις τριπλέτες κωδικονίων που το βακτήριο από μόνο του δεν έχει την ικανότητα. Οι σειρές κυττάρων αποτελούν υποπληθυσμό ο οποίος έχει επιλεγεί θετικά από καλλιέργεια ενός αρχικού κυττάρου. Κάθε σειρά θα έχει υποστεί περαιτέρω γενετικές αλλαγές σε σχέση με το πατρικό κύτταρο, αλλαγές που μπορεί να το έχουν μετατρέψει για παράδειγμα σε λιγότερο ή περισσότερο ογκογόνο ως προς τη βασική σειρά κυττάρων από την οποία προήλθε, ή να καταλήγει λόγω επιμολύνσεων να διαφοροποιείται εντελώς από την αρχική[33].

Έχουν προκύψει ποικίλες κυτταρικές σειρές και με διαφορετικές ιδιότητες, από τις οποίες κάποιες είναι περισσότερο κατάλληλες όταν ο σκοπός του πειράματος είναι η έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών. Για παράδειγμα η εμπορική σειρά κυττάρων **BL 21 (DE3) Codon Plus-RIL** έχει τροποποιηθεί ώστε να μπορεί να διαβάσει κάποια από τα σπάνια κωδικόνια όπως αυτά της *Arginine* (AGG/AGA), *Isoleucine* (AUA) και *Leucine* (CUA). Η σειρά **BL 21 (DE3) Codon Plus-RP** έχει την ικανότητα να κωδικοποιεί τα εξής σπάνια κωδικόνια, *Arginine* (AGG/AGA) και *Proline* (CCC). Τα κύτταρα **Rosetta** ή **Rosetta (DE3)** είναι ιδανικά για γονίδια που περιέχουν σε μεγάλο ποσοστό τα κωδικόνια *Arginine*(AGG/AGA), *Arginine* (CGG), *Isoleucine* (AUA), *Leucine* (CUA), *Proline* (CCC) και *Glycine* (GGA). Επίσης υπάρχουν κυτταρικές σειρές οι οποίες περιέχουν μεταλλάξεις που εξαλείφουν την παραγωγή των πρωτεασών και η χρήση τους μπορεί να βοηθήσει στην απόδοση της έκφρασης καθώς μειώνεται κατά πολύ η πρωτεολυτική αποδόμηση των πρωτεϊνών. Για παράδειγμα η κυτταρική σειρά **BL 21** που αναφέραμε και παραπάνω έχει ατελή παραγωγή δύο πρωτεασών οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *lon* και *omtP*[34].

1.1.6.2. Βελτιστοποίηση γονιδίου (optimization).

Πολλές φορές η προσεγμένη επιλογή της κατάλληλης κυτταρικής σειράς δεν είναι αρκετό για να λυθεί το πρόβλημα της συχνότητας εμφάνισης των σπάνιων κωδικονίων, με αποτέλεσμα η απόδοση της έκφρασης να μην βελτιώνεται. Όταν η πρωτεΐνη που στοχεύουμε περιέχει μεγάλο ποσοστό από αυτές τις τριπλέτες, κάτι το οποίο συμβαίνει συχνά ειδικά όταν πρόκειται για μία μεγάλη πρωτεΐνη, τότε η εξειδίκευση αυτών των σειρών να κωδικοποιούν συγκεκριμένα κωδικόνια δεν είναι αρκετή. Σε αυτές τις

περιπτώσεις, εφόσον έχουν προηγουμένως δοκιμαστεί διάφορες τεχνικές επίλυσης του προβλήματος χωρίς να έχουν αποδώσει, η οδός που πρέπει να ακολουθηθεί είναι η βελτιστοποίηση (*optimization*) του γονιδίου.

Η βελτιστοποίηση του γονιδίου, σαν μέθοδος βασίζεται στην αντικατάσταση των κωδικονίων που αδυνατεί να διαβάσει η *E.coli* με κωδικόνια που είναι πιο αρεστά από το βακτήριο χωρίς να αλλάζει όμως η αμινοξική ακολουθία. Το γονίδιο συνθέτεται από την αρχή και στη θέση των σπάνιων κωδικονίων πραγματοποιούνται σιωπηλές μεταλλάξεις. Δηλαδή το βακτήριο μπορεί να μην έχει την ικανότητα να κωδικοποιήσει την τριπλέτα **CCC** η οποία αντιστοιχεί στο αμινοξύ *Proline* (βλ. Πίνακα 1). Εάν όμως με στοχευμένη μετάλλαξη αυτή η τριπλέτα **CCC** αντικατασταθεί από την τριπλέτα **CCG** η οποία δίνει και αυτή το αμινοξύ *Proline*, τότε η αλλαγή στο γονίδιο είναι σιωπηλή και η ακολουθία των αμινοξέων που απαρτίζουν την επιθυμητή πρωτεΐνη παραμένει ίδια. Συνεπώς η πρωτεΐνη που θα εκφραστεί θα είναι ποιοτικά η ίδια με αυτήν του αρχικού γονιδίου κ χωρίς να δυσκολεύει το βακτήριο να την εκφράσει. Έτσι μέσω της βελτιστοποίησης των γονιδίων λαμβάνουμε το επιθυμητό προϊόν έχοντας ξεπεράσει τα εμπόδια από την ελλιπή ικανότητα της *E.coli* να κωδικοποιεί κωδικόνια που χρησιμοποιούνται σπάνια από το βακτήριο.

Μέσα στα πλαίσια της βελτιστοποίησης του γονιδίου, μπορεί να χρειαστεί να γίνουν αλλαγές στην αλληλουχία κωδικονίων που βρίσκονται στην περιοχή έναρξης της μετάφρασης και έχουν την τάση να σχηματίζουν δευτεροταγή δομή. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως με την αύξηση των περιοχών που αποτελούνται από Αδενίνες στα συγκεκριμένα σημεία. Επίσης αλλαγές μπορεί να χρειαστούν στο δεύτερο κωδικόνιο μετά το Ν-τελικό άκρο της αλληλουχίας. Αυτό συμβαίνει γιατί όταν παρατηρούμε τις ενδογενείς πρωτεΐνες της *E.coli* βλέπουμε ότι δεν χρησιμοποιούνται όλα τα κωδικόνια στην ίδια συχνότητα, αλλά κυρίως εμφανίζεται η τριπλέτα AAA που κωδικοποιεί το αμινοξύ *Lysine* ενώ άλλες τριπλέτες δεν εμφανίζονται καθόλου. Για αυτό η επιλογή του σωστού κωδικονίου για αυτή τη συγκεκριμένη θέση ή η αλλαγή του σε ένα κωδικόνιο πιο συχνά χρησιμοποιούμενο από το βακτήριο μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα της έκφρασης[35]. Σημαντικό μπορεί να είναι και το ποσοστό της εμφάνισης περιοχών GC κοντά στο 5'-τελικό άκρο του γονιδίου, καθώς όταν είναι αρκετά μεγάλο μπορεί να οδηγεί στο σχηματισμό δευτεροταγής δομής στο *mRNA* με αποτέλεσμα η μετάφραση να είναι διακοπτόμενη και άρα τα επίπεδα έκφρασης χαμηλά. Ενώ με αντικατάσταση των GC με περισσότερα Α και Τ, πάντα χωρίς να αλλάζει η αμινοξική αλληλουχία, η απόδοση αυξάνεται[36].

1.1.6.3. Διαλυτότητα πρωτεϊνών

Ένα ακόμα από τα σημαντικά εμπόδια που μπορεί να συναντήσουμε κατά την ετερόλογη έκφραση στο σύστημα της *E.coli*, και όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, είναι η πρωτεΐνη να εκφράζεται μεν αλλά με τη μορφή έγκλειστων σωματίων δε. Γενικά η λύση αυτού του προβλήματος είναι η δοκιμή διάφορων συνθηκών μέχρι να βρούμε αυτές που θα ταιριάζουν καλύτερα στην πρωτεΐνη και θα μας δίνουν την έκφραση με τη μεγαλύτερη δυνατή διαλυτότητα. Οι δοκιμές μπορούν αρχικά να αφορούν τις συνθήκες της επαγωγής. Αλλάζοντας θερμοκρασία, διάρκεια επαγωγής ή τη συγκέντρωση του επαγωγέα (*IPTG*) η διαλυτότητα της πρωτεΐνης μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά. Με τη μείωση της θερμοκρασίας τα κύτταρα εισέρχονται σε μια κατάσταση υπολειτουργίας, δηλαδή μπαίνουν σε πιο αργούς ρυθμούς από τους προβλεπόμενους και άρα η γενικότερη σύνθεση πρωτεϊνών είναι μειωμένη, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα η πρωτεΐνη μας να είναι διαλυτή.

Η συγκέντρωση του επαγωγέα και το πότε είναι η κατάλληλη στιγμή να πραγματοποιήσουμε την επαγωγή εξαρτάται από τη φύση της πρωτεΐνης και από το πλασμίδιο που έχει επιλεγεί για την κλωνοποίηση. Μεγαλύτερη επιτυχία θα έχει η επαγωγή όταν η καλλιέργεια βρίσκεται σε $OD_{600} = 0.5-0.8 Abs$, καθώς ναι μεν βρίσκονται σε εκθετική φάση χωρίς όμως να υπάρχει και υπερβολική συσσώρευση πληθυσμού, ώστε να αποφευχθεί η αναστολή του πολλαπλασιασμού λόγω έλλειψης θρεπτικού υλικού ή μεγάλης συγκέντρωσης αποβλήτων του μεταβολισμού που θα είναι τοξικά για τα ίδια τα κύτταρα. Όσον αφορά την συγκέντρωση του επαγωγέα, οι τιμές κυμαίνονται ανάμεσα στο $0.1mM$ με $1.0mM$ ή και μεγαλύτερες και εξαρτάται από το σθένος της επαγωγής που θέλουμε να επιτύχουμε, όπως επίσης και από το είδος των κυττάρων και το πλασμίδιο που χρησιμοποιούμε. Ανάλογα με το είδος της πρωτεΐνης επιλέγεται η καλύτερη συνθήκη, όπως για παράδειγμα πρωτεΐνες που δεν είναι σταθερές προτιμάται να επάγονται σε τιμές ανάμεσα στο $0.2mM$ και στο $0.5mM$, ενώ σε περιπτώσεις στις οποίες η παραγωγή του *Iac* καταστολέα είναι μεγάλη θα προτιμηθούν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις *IPTG*.

Το χρονικό διάστημα στο οποίο θα γίνει η επαγωγή συνδέεται άμεσα με τη θερμοκρασία. Όταν έχουμε να κάνουμε με πρωτεΐνες οι οποίες εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα μπορούμε να περιορίσουμε την επαγωγή στις 2-4 ώρες και στους $37^{\circ}C$. Αυτό συμβαίνει γιατί ο επαγωγέας (*IPTG*) έχει συγκεκριμένη ισχύ και στους $37^{\circ}C$ μετά το πέρας 4 ωρών παύει η δράση του. Για πρωτεΐνες όμως που δεν έχουν υψηλή απόδοση είναι προτιμότερο να πραγματοποιείται η επαγωγή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες όπως $25^{\circ}C$,

18°C ή 16°C και ο χρόνος επώασης να φτάνει τις 15-18 ώρες (*Overnight*), εάν κ εφ'όσον το προϊόν που επιθυμούμε είναι αρκετά σταθερό και μπορεί να επιβιώσει σε αυτό το μεγάλο διάστημα επώασης. Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες κ η μεγαλύτερη διάρκεια επαγωγής βοηθούν ρίχνοντας τους ρυθμούς των κυττάρων επιτρέποντας στις πρωτεΐνες να έχουν περισσότερο χρόνο για να αναδιπλωθούν σωστά αυξάνοντας έτσι την απόδοση της έκφρασης. Συνεπώς καταλαβαίνουμε ότι η διάρκεια της επαγωγής είναι ανάλογη της θερμοκρασίας που έχουμε επιλέξει. Η επιλογή του χρόνου και της θερμοκρασίας είναι κάτι που μπορεί να γίνει εύκολα με μία απλά δοκιμή πολλών διαφορετικών τιμών θερμοκρασίας και χρόνου μέχρι να καταλήξουμε στις καταλληλότερες συνθήκες.

Η διαλυτότητα μπορεί να επηρεαστεί και από το είδος του υποκινητή του πλασμιδίου. Ο υποκινητής βρίσκεται τοποθετημένος σε απόσταση 10-100 νουκλεοτιδίων από το γονίδιο ενδιαφέροντος και η καταλληλότητά του ορίζεται από τρία χαρακτηριστικά. Αρχικά θα πρέπει να είναι αρκετά ισχυρός ώστε να επιτρέπει η συσσώρευση του επιθυμητού προϊόντος να φτάνει το μέγιστο δυνατό ποσοστό της συνολικής ποσότητας των παραγόμενων πρωτεϊνών του κυττάρου. Επίσης θα πρέπει να μπορεί η επαγωγή του να πραγματοποιείται εύκολα. Και τέλος είναι απαραίτητο να παρουσιάζει ένα ελάχιστο επίπεδο βασικής μεταγραφής. Δηλαδή σε περιπτώσεις στις οποίες η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος είναι τοξική ή επιβλαβής για την ανάπτυξη του κυττάρου ξενιστή, είναι ιδιαίτερα σημαντικός ένας υποκινητής που να μπορεί να κατασταλεί σε υψηλά επίπεδα. Επίσης όπως αναφέραμε και παραπάνω, πολύ συχνά σαν υποκινητής προτιμάται ο *T7-lac operator*, ο οποίος όμως είναι ένας ισχυρός υποκινητής. Προέρχεται από τον T7 βακτηριοφάγο κ οδηγεί την συσσώρευση της επιθυμητής πρωτεΐνης στο 40-50% του συνολικού ποσοστού των πρωτεϊνών του κυττάρου, έχοντας σε μερικές περιπτώσεις το αποτέλεσμα της μη σωστής αναδίπλωσης και άρα τον σχηματισμό έγκλειστων σωμάτων. Έτσι όταν έχουμε πρόβλημα με τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης μας καλό θα ήταν να χρησιμοποιούμε έναν πιο ασθενή υποκινητή όπως για παράδειγμα ο *trc*, ο οποίος οδηγεί σε παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος σε χαμηλότερα επίπεδα της τάξεως του 15-30% του συνόλου των πρωτεϊνών, αποφεύγοντας έτσι τη μη σωστή αναδίπλωση.

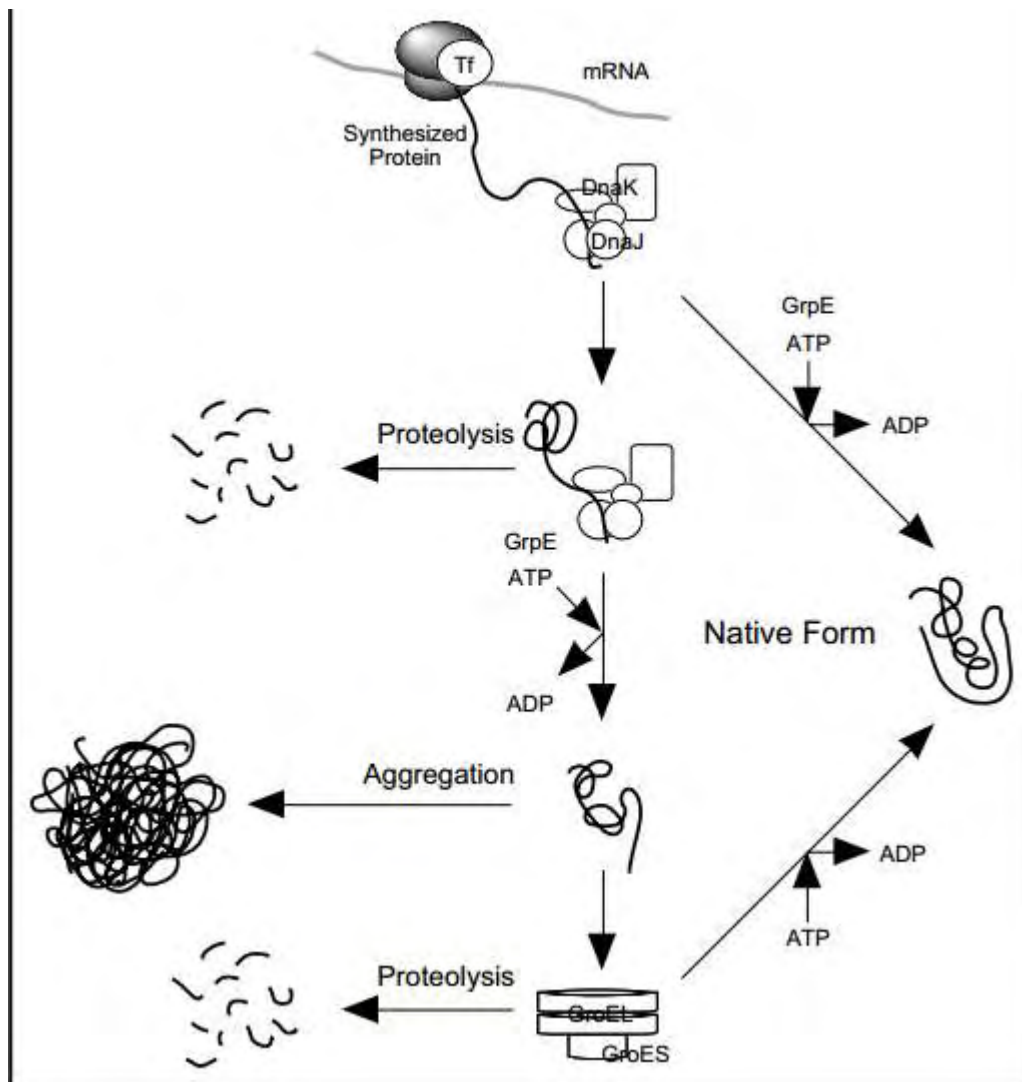
Βελτίωση της διαλυτότητας μπορεί να προκύψει και με την επιλογή πλασμιδίων με χαμηλό αριθμό αντιγράφων (*low copy number plasmid*), τα οποία δεν επιβαρύνουν κατά πολύ τον ξενιστή επιτρέποντας έτσι την παραγωγή της πρωτεΐνης να πραγματοποιηθεί με πιο ομαλές συνθήκες. Όπως επίσης κ διάφορες αλλαγές στο θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιούμε μπορεί να έχουν θετικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα μπορούν να

προστεθούν μέσα στο υλικό ανάπτυξης, πρόσθετες ομάδες ή συμπαράγοντες που βοηθούν στην σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να διατηρείται σταθερό το pH ή ακόμα και προσθήκη ουσιών όπως η σορβιτόλη και η σουκρόζη, οι οποίες αυξάνουν την οσμωτική πίεση του κυττάρου οδηγώντας στην ενεργοποίηση μηχανισμών για την ισορρόπηση της που έχουν σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της πρωταρχικής δομής των πρωτεϊνών.

1.1.6.4. Συνέκφραση με Μοριακούς Συνοδούς

Η συνέκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης με πρωτεΐνες συνοδούς, τα γνωστά *chaperones*, είναι μία τεχνική η οποία αποτελεί ένα μεγάλο κεφάλαιο στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου *DNA* και ένα σημαντικό κλειδί στην σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Τα *chaperones* είναι λειτουργική ομάδα πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αναδίπλωση των πρωτεϊνών στα κύτταρα κάτω από φυσιολογικές ή στρεσογόνες συνθήκες. Έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να προσδένονται σε μη φυσιολογικά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, εμποδίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο την απροσδιόριστη συσσωμάτωση. Συνδυασμός μεταξύ διαφορετικών μηχανισμών των *chaperones* δημιουργεί ένα συνεργατικό δίκτυο, το οποίο επιτρέπει να διατηρηθεί η ομοιότητα της επιθυμητής πρωτεΐνης κάτω από συνθήκες που δεν θα επιτρέπεται η αυθόρμητη αναδίπλωση[37].

Πρόσφατα έγινε ξεκάθαρο ότι η *in vivo* αναδίπλωση των πρωτεϊνών είναι μία ενεργο-εξαρτώμενη διαδικασία η οποία διαμεσολαβείται από δύο κατηγορίες ρυθμιστών, τα μοριακά *chaperones* και τους καταλύτες αναδίπλωσης. Πιο συγκεκριμένα, συστήματα μοριακών *chaperones* όπως τα *DnaK-DnaJ-GrpE* και *GroEL-GroES* καταστέλλουν τις παράτυπες συσσωματώσεις και διευκολύνουν την σωστή αναδίπλωση μέσω *ATP*-συντονιζόμενων κύκλων πρόσδεσης ενώ παράλληλα απελευθερώνουν τα ενδιάμεσα προϊόντα της αναδίπλωσης. Καταφέροντας λοιπόν να χειριστούμε το περιβάλλον της αναδίπλωσης μέσω της αύξησης των ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων όλων ή κάποιων ειδικών ρυθμιστών αναδίπλωσης, μπορούμε να διευκολύνουμε κατά πολύ την παραγωγή και την απομόνωση ετερόλογων πρωτεϊνών[38]. Στην εικόνα 5 εμφανίζεται ο μηχανισμός κατά τον οποίο τα *chaperones* προωθούν την σωστή αναδίπλωση.



Εικόνα 5: Πιθανό μοντέλο έκφρασης πρωτεΐνης σε *E.coli* υποβοηθούμενη από μοριακούς συνοδούς[39].

Με την πρόοδο της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου *DNA*, έχουν καταστεί ελεύθερα στο εμπόριο διάφορα 'εργαλεία' που καλύπτουν τις ανάγκες για την συνέκφραση πρωτεϊνών και η επιλογή ενός από αυτών αυξάνει την πιθανότητα ανάκτησης διαλυτού προϊόντος και ελαχιστοποιεί την απώλεια. Ένα τέτοιο πρωτόκολλο, που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διπλωματική είναι αυτό του *Takara Chaperone Plasmid Set*. Το εργαλείο αυτό για παράδειγμα αποτελείται από πέντε διαφορετικά πλασμίδια, όπου το κάθε ένα είναι σχεδιασμένο να εκφράζει πολλαπλά μοριακά *chaperones* τα οποία λειτουργούν μαζί σαν ομάδα, ώστε να καταστεί δυνατή η βέλτιστη έκφραση και αναδίπλωση της πρωτεΐνης στόχου.

Όταν επιλέγουμε ένα σύστημα συνέκφρασης θα πρέπει να λάβουμε υπ' όψη μας ότι το κάθε πλασμίδιο θα πρέπει να περιέχει, πέρα από την περιοχή αντιγραφής (*ORF*), και ένα γονίδιο που θα του προσδίδει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό, αλλά διαφορετικό από αυτό του πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο στόχο, ώστε να μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ των αποικιών που προσέλαβαν το γονίδιο της επιθυμητής πρωτεΐνης και αυτών που όχι. Ιδιαίτερη σημασία επίσης έχει τα γονίδια που εκφράζουν τα *chaperones* και τα γονίδια που εκφράζουν το προϊόν, να ρυθμίζονται από διαφορετικούς υποκινητές, για να είναι δυνατόν η επαγωγή τους να μπορεί να πραγματοποιείται ξεχωριστά[40]. Στο παράδειγμα του *Takara Chaperone Plasmid Set* ένα από τα πλασμίδια, το *pGro7*, εκφράζει τους μοριακούς συνοδούς *GroES* και *GroEL*, ρυθμίζεται από υποκινητή *araB* και επάγεται από την *L*-αραβινόζη (το γονίδιο στόχος επάγεται από *IPTG*), ενώ παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη (διαφορετικό από την ανθεκτικότητα του επιθυμητού γονιδίου π.χ. σε αμπικιλίνη).

1.2. Φωσφορυλάση του Γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι το καθοριστικό ένζυμο για την διάσπαση του γλυκογόνου. Καταλύει την ρυθμιζόμενη φωσφορυλίωση ενός α -1,4 γλυκοζιτικού δεσμού στο γλυκογόνο και αποδίδει 1-φωσφορική γλυκόζη (G1P), η οποία στη συνέχεια ακολουθεί το μεταβολικό μονοπάτι για να καλύψει τις ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού. Η GP απαντάται σε τρεις ισομορφές, την ηπατική (hGP), την μυϊκή (hmGP) και του εγκεφάλου (hbGP) και κωδικοποιούνται η κάθε μία από τα γονίδια PYGL, PYGM και PYGB αντίστοιχα. Ο ορισμός τους βασίζεται στους ιστούς στους οποίους εκφράζονται, και ενώ οι ισομορφές της μυϊκής και του εγκεφάλου εξυπηρετούν τους ίδιους τους ιστούς, η ηπατική ισομορφή καλύπτει τις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού. Υπάρχει ομοιότητα της τάξεως του 97% μεταξύ της ανθρώπινης και αντίστοιχων τρωκτικών και περίπου 80% της ηπατικής με την μυϊκή και του εγκεφάλου[41]. Και οι τρεις ανθρώπινες ισομορφές ρυθμίζονται αλλοστερικά από μικρά ρυθμιστικά μόρια και από τη φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου σερίνης (Ser-14), που προκαλεί εναλλαγή στη διαμόρφωση μεταξύ ενεργής και ανενεργής μορφής[42]. Η φωσφορυλάση ήταν το πρώτο ένζυμο που παρατηρήθηκε ότι ρυθμίζεται μέσω ομοιοπολικής φωσφορυλίωσης[43] όπως επίσης ανακαλύφθηκε πρόσφατα ότι ρυθμίζεται αρνητικά και μέσω ακετυλίωσης λυσίνης (Lys470) είτε με άμεση αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου είτε με προώθηση αποφωσφορυλίωσης[44].

Η ενεργοποίηση του ενζύμου γίνεται είτε μέσω φωσφορυλίωσης είτε με δέσμευση *AMP* και η μορφή του ορίζεται ως *a* (*GPa*), ενώ η μη ενεργή μορφή είναι μη φωσφορυλιωμένη και ορίζεται ως *b* (*GPb*). Στην ουσία το ένζυμο βρίσκεται σε μια ισορροπία μεταξύ αυτών των δύο διαμορφώσεων, δηλαδή σε διαμόρφωση *R* (ενεργό) και σε διαμόρφωση *T* (ανενεργό). Κατά την *R*-κατάσταση παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια με υποστρώματα και συγκεκριμένους αλλοστερικούς ρυθμιστικούς παράγοντες, όπως είναι το *AMP*, ενώ κατά την *T*-κατάσταση παρουσιάζει μειωμένη συγγένεια προς υποστρώματα, προς γλυκογόνο ή προς ορθοφωσφορικό (*Pi*)[45]. Τόσο το *AMP* όσο και το *ATP* προσδένονται σε αλλοστερική περιοχή είτε από την πλευρά της φωσφορυλίωσης είτε από την πλευρά του καταλυτικού κέντρου. Όταν συνδεθούν στο καταλυτικό κέντρο *Pi* ή *G1P* τότε σταθεροποιείται η *R*-κατάσταση, ενώ όταν συνδεθεί γλυκόζη σταθεροποιείται η *T*-κατάσταση[46].

Η *hGP* υφίσταται ως ένα ομοδιμερές που αποτελείται από δύο πανομοιότυπα μονομερή. Για τη *hmGP* το κάθε μονομερές αποτελείται από 841 μονάδες. για την *hIGP* κάθε μονομερές αποτελείται από 846 μονάδες και για την *hbGP* κάθε υπομονάδα αποτελείται από 862 μονάδες. Το ένα κομμάτι που περιέχει το πεπτίδιο της φωσφορυλίωσης και την περιοχή πρόσδεσης του *AMP*, ονομάζεται ρυθμιστική περιοχή και βρίσκεται εκτεθειμένο στο κυτοσόλιο, όπου μπορεί να αλληλεπιδράσει με κινάση, φωσφατάση και διάφορους αλλοστερικούς παράγοντες. Το άλλο κομμάτι, στην αντίθετη πλευρά του ενζύμου, αποτελεί την καταλυτική περιοχή και βρίσκεται συνδεδεμένο με το μόριο του γλυκογόνου. Κάθε μονομερές περιλαμβάνει ένα N-τελικό και ένα C-τελικό άκρο του ίδιου περίπου μεγέθους[47].

Το N-τελικό άκρο περιέχει πολλές ρυθμιστικές περιοχές. Μία από αυτές είναι η *Ser-14* η οποία ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση. Άλλη μία είναι η αλλοστερική περιοχή ενεργοποίησης, που προσδένει το *AMP* ή και άλλους φωσφορυλιτικούς παράγοντες όπως είναι η 6-φωσφορική γλυκόζη (*G6P*), το *ATP* και η 1-φωσφατάση της φρουκτόζης. Στο N-τελικό άκρο εντοπίζεται και η αλλοστερική περιοχή πρόσδεσης του γλυκογόνου. Τέλος στο N-τελικό άκρο υπάρχουν και τα δομικά στοιχεία των περιοχών για την πρόσδεση πουρινών και γλυκόζης, όπως επίσης και τα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι απαραίτητα για την εξάπλωση των αλλοστερικών αποτελεσμάτων. Το C-τελικό άκρο περιέχει την περιοχή πρόσδεσης του συμπαράγοντα και μαζί με κάποια κατάλοιπα από το N-τελικό άκρο αποτελούν το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου[48].

Όλες οι GP περιέχουν φωσφορική πυριδοξάλη (*PLP*) σαν συμπαράγοντα[49][50], που προσδένεται μέσω της δημιουργίας βάσης *Schiff* με την πλευρική ομάδα της λυσίνης (*Lys*-

680) στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Μελέτες που αφορούσαν την απομάκρυνση της *PLP* από το ολοένζυμο και ανασύστασή του, είτε με *PLP*, είτε με πυριδοξάλη ή με ανάλογα της *PLP*, υπέδειξαν την απόλυτη αναγκαιότητα στην παρουσία του συμπαράγοντα για την ενεργότητα του ενζύμου[49][51]. Η *PLP* είναι ένα παράγωγο της πυριδοξίνης, αλλιώς γνωστή και ως Βιταμίνη Β6, μίας υδατοδιαλυτής βιταμίνης που δρα σαν συνένζυμο. Η φωσφορική πυριδοξάλη έχει έναν δακτύλιο πυριδίνης που είναι ήπια βασικός και μία φαινολική υδροξυλική ομάδα που είναι ήπια όξινη, επιτρέποντας έτσι στα παράγωγά της να μπορούν να σχηματίζουν σταθερές ταυτομερείς μορφές. Η πιο σημαντική λειτουργική ομάδα της *PLP* είναι η αλδεϋδική ομάδα που της επιτρέπει να σχηματίζει ενδιάμεσες ομοιοπολικές ενώσεις βάσεων *Schiff* με υποστρώματα αμινοξέων[46]. Ο μηχανισμός δράσης της *PLP*, ως συμπαράγοντα της *GP*, βασίζεται στην λειτουργία της σαν ένας οξεοβασικός καταλύτης καθώς σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό που συμμετέχει στον μηχανισμό συμπεριφέρεται αρχικά ως δότης και μετά ως δέκτης ηλεκτρονίων. Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο του C4 της αλυσίδας του γλυκογόνου που πρόκειται να αποχωρήσει και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την *PLP*. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται προσβάλλεται στην συνέχεια από το ορθοφωσφορικό προς σχηματισμό φωσφορικής γλυκόζης δεσμού α-1 και ένα άτομο υδρογόνου επιστρέφει πίσω στην *PLP*[46]. Ουσιαστικά ο ρόλος της *PLP* στην φωσφορυλιτική διάσπαση του γλυκογόνου είναι να διευκολύνει τον αποκλεισμό νερού από το ενεργό κέντρο του ενζύμου, κάτι που θα οδηγούσε σε υδρολυτική διάσπαση και απόδοση ελεύθερης μη φωσφορυλιωμένης γλυκόζης και άρα σε μεγαλύτερη κατανάλωση ενέργειας από το κύτταρο.

1.2.1. Ηπατική Φωσφορυλάση του Γλυκογόνου

Η *hIGP* ρυθμίζεται με διάφορους αλλοστερικούς τελεστές οι οποίοι σηματοδοτούν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου καθώς και με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση, ως απόκριση σε ορμονικά σήματα όπως της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης. Η ρύθμισή της διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών γιατί ο ρόλος της είναι να διατηρεί την ομοιόσταση της γλυκόζης στον οργανισμό ως σύνολο[46]. Η διάσπαση του γλυκογόνου από το ένζυμο αυτό, έχει σαν σκοπό την παραγωγή και την διοχέτευση γλυκόζης στο αίμα και στους ιστούς όταν τα επίπεδά της είναι χαμηλά. Συνεπώς όταν οι απαιτήσεις του οργανισμού σε γλυκόζη είναι καλυμμένες, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου θα πρέπει να καταστέλλεται, να απενεργοποιείται δηλαδή μπαίνοντας από την R-κατάσταση στην T-

κατάσταση. Αυτό γίνεται μέσω μετατόπισης της αλλοστερικής ισορροπίας μετά την σύνδεση γλυκόζης στην φωσφορυλάση *a*.

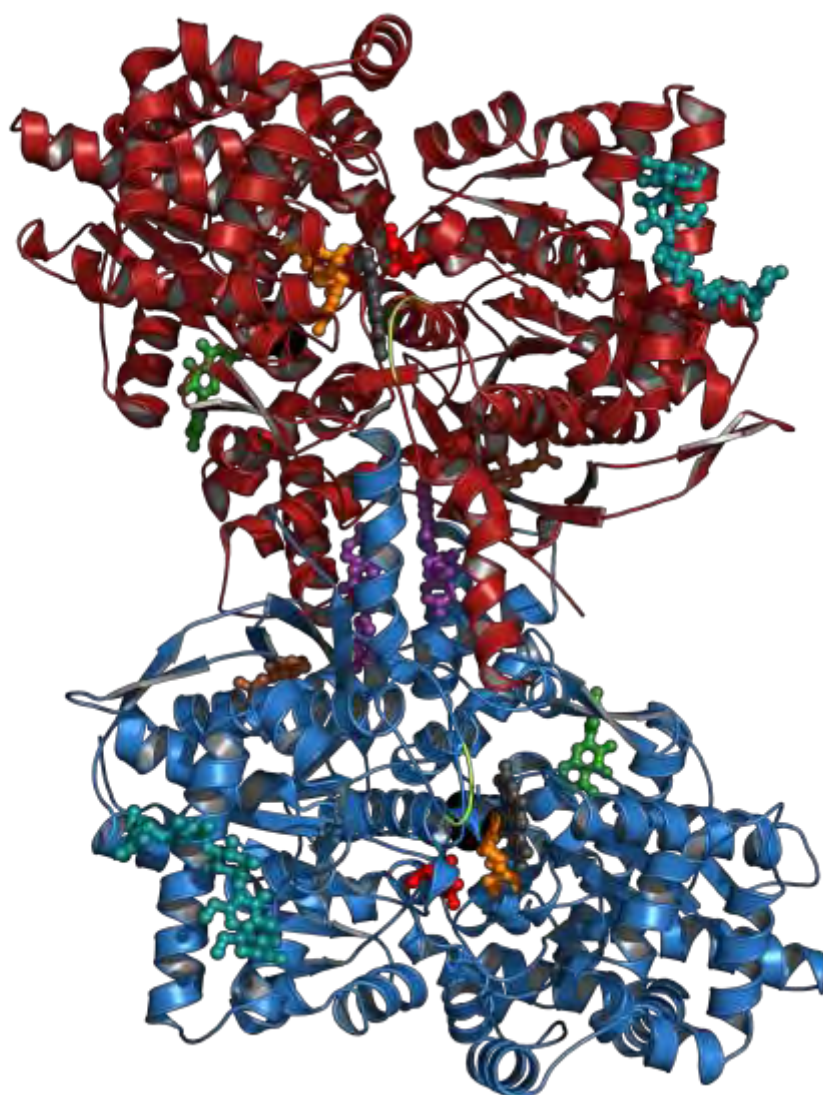
Σε αντίθεση με τη μυϊκή ισομορφή, στην ηπατική το *AMP* προκαλεί πολύ μικρή ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης *b* (*GPb*) εκτός από ορισμένες πολύ συγκεκριμένες περιπτώσεις. Το *AMP* αυξάνει το βαθμό συγγένειας προς την 1-φωσφορική γλυκόζη, αλλά καθώς η ηπατική φωσφορυλάση προσδένει *AMP* σε μικρότερο βαθμό το αποτέλεσμα είναι πολύ μικρότερης έκτασης σε σχέση με αυτό της μυϊκής[52]. Η φωσφορυλάση *b* δεν παρουσιάζει δραστικότητα *in vivo* και η αντίστοιχη ενεργοποίηση του ενζύμου εξαρτάται ολοκληρωτικά από την μετατροπή της *GPb* σε *GPa*, κάτι το οποίο πραγματοποιείται με τη δράση διάφορων αλλοστερικών τελεστών που σταθεροποιούν την T- ή την R-κατάσταση. Το ένζυμο που καταλύει αυτή την αλληλομετατροπή είναι η Κινάση της φωσφορυλάσης (*PhK*), μία μεγάλη πρωτεΐνη, στοιχειομετρίας (αβγδ)₄. Η καταλυτική της δραστικότητα εντοπίζεται στην γ υπομονάδα και οι υπομονάδες α και β αποτελούν ρυθμιστικές περιοχές που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της *GP*. Η δ υπομονάδα (καλμοδουλίνη) προσδίδει στην κινάση, ευαισθησία στο ασβέστιο. Η *PhK* προωθεί τη διάσπαση του γλυκογόνου προς απελευθέρωση γλυκόζης, ως απόκριση στην αύξηση των επιπέδων ασβεστίου και *cAMP*, στο κύτταρο[53][54].

Η *PhK* φωσφορυλιώνει την *GP* σε δύο κατάλοιπα σερίνης, προκαλώντας μία αλλαγή διαμόρφωσης που ευνοεί περισσότερο την σταθεροποίηση της ενεργής μορφής *a*, και όχι της ανανεργής μορφής *b*[46]. Η T-κατάσταση σταθεροποιείται από μόρια γλυκόζης που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, από την πρόσδεση καφεΐνης και ουρικού οξέος στην περιοχή πρόσδεσης πουρίνης και από την πρόσδεση της *G6P* σε μία περιοχή που αλληλεπικαλύπτεται με την περιοχή πρόσδεσης του *AMP*. Ενώ αντίστοιχα η R-κατάσταση σταθεροποιείται όταν *AMP* προσδεθεί στην περιοχή πρόσδεσης *AMP*. Όταν το ένζυμο είναι σε θέση να εισέλθει στην ανανεργή μορφή του, το N-τελικό άκρο που είναι φωσφορυλιωμένο αποδιατάσσεται και γίνεται προσβάσιμο στην πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (*PP1*) που θα οδηγήσει στην αποφωσφορυλίωσή του[48].

Η σηματοδότηση για την ενεργοποίηση της *hlGP* έχει ως εξής : η γλυκαγόνη προσδένεται σε ειδικούς υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη των ηπατικών κυττάρων και ενεργοποιεί την υπομονάδα α μίας ετεροτριμερούς πρωτεΐνης, της *Gs*, διαβιβάζοντας έτσι ένα ειδικό εξωκυτταρικό σήμα μέσα στο κύτταρο μέσω δομικών αλλαγών. Στη συνέχεια ενεργοποιείται η αδενολική κυκλάση, μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία καταλύει τον σχηματισμό της κυκλικής *AMP* που αποτελεί τον δεύτερο αγγελιαφόρο του σήματος. Καθώς

η συγκέντρωση της κυκλικής *AMP* αυξάνεται, ενεργοποιείται η πρωτεϊνική κινάση *A* μέσω δέσμευσης της κυκλικής *AMP* στην ρυθμιστική υπομονάδα και απελευθερώνοντας την καταλυτική υπομονάδα που θα φωσφορυλιώσει την υπομονάδα β της *PhK* η οποία στο τέλος θα ενεργοποιήσει τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Επίσης η σηματοδότηση για τον τερματισμό της αποικοδόμησης του γλυκογόνου από την ηπατική φωσφορυλάση καθορίζεται και αυτή από την πρωτεϊνική κινάση *A*, μέσω προσθήκης μίας ακόμα φωσφορικής ομάδας στην α υπομονάδα της κινάσης μετατρέποντάς την έτσι σε καλύτερο υπόστρωμα για να δράσει η πρωτεϊνική φωσφατάση που ενεργοποιείται από την ινσουλίνη και έρχεται για να απομακρύνει την φωσφορική ομάδα από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου μετατρέποντας το ένζυμο στην ανενεργή του διαμόρφωση, την διαμόρφωση *b*[46].

Από τα παραπάνω καταλαβαίνουμε ότι η ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου από την ηπατική φωσφορυλάση είναι μία αυστηρή και πολύπλοκη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται πολλοί παράγοντες και διάφορα ένζυμα, ώστε τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα να παραμένουν μέσα στα όρια των ενεργειακών αναγκών του οργανισμού. Η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της ενεργής (*GPa*) και της ανενεργής (*GPb*) διαμόρφωσης του ενζύμου είναι βασική και για το λόγο αυτό το κύτταρο διαθέτει τόσους μηχανισμούς για διατήρηση της ομοιόστασης. Το ήπαρ ανιχνεύει τα ποσοστά γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος και ανάλογα προσλαμβάνει ή απελευθερώνει γλυκόζη. Στην ουσία ο κύριος αισθητήρας των ηπατικών κυττάρων είναι η *GPa*, καθώς μέσω της πρόσδεσης γλυκόζης μετατοπίζεται η αλλοστερική ισορροπία της από την ενεργό διαμόρφωση *R* στην ανενεργό *T*. Αυτή η αλλαγή στη στερεοδιάταξη είναι που καθιστά τη φωσφορική ομάδα της *Ser14* το υπόστρωμα για να δράσει η πρωτεϊνική φωσφατάση 1.



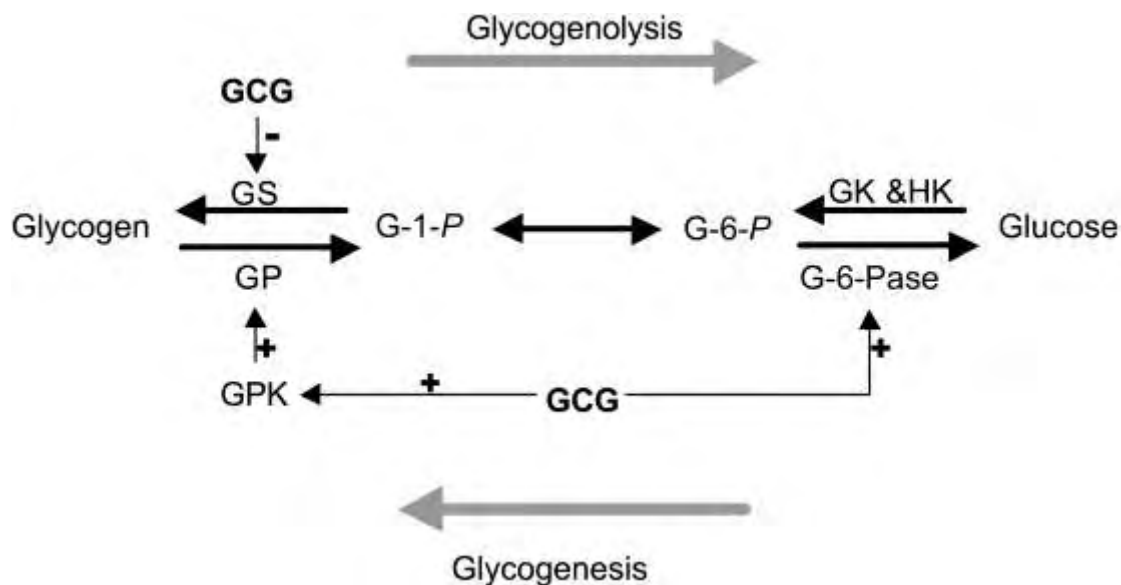
Εικόνα 6: Δομή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφυλάσης του γλυκογόνου. Με κόκκινο: το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Με κυανό: το κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου[80]. Με γκρι: το κέντρο αναστολής. Με πορτοκαλί: PLP. Με μαύρο: Ser-14. Με πράσινο: κερσετίνη[81]. Με καφέ: το αλλοστερικό κέντρο. Με μωβ: το νέο αλλοστερικό κέντρο. Με κίτρινο: ο βρόχος 280S.

1.2.2. Ο Μεταβολισμός του Γλυκογόνου

Η αποικοδόμηση και η σύνθεση του γλυκογόνου ρυθμίζονται αντίρροπα. Η αποικοδόμηση συνίσταται στα στάδια απελευθέρωσης 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο, ανακατασκευής του υποστρώματος γλυκογόνου για νέα αποικοδόμηση και μετατροπής της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Η 6-φωσφορική γλυκόζη ακολουθεί περαιτέρω μεταβολισμό προς τρεις κατευθύνσεις. Είτε αποτελεί το αρχικό υπόστρωμα για την πορεία της γλυκόλυσης ώστε να χρησιμοποιηθεί από τον οργανισμό σε αναερόβιο ή αερόβιο μεταβολισμό (π.χ. στους μυς ή στον εγκέφαλο), είτε ακολουθεί την πορεία των φωσφορικών πεντοζών για να αποδόσει *NADPH* και να παραχθεί ριβόζη σε μία ποικιλία ιστών, είτε τέλος να μετατραπεί σε ελεύθερη γλυκόζη στο ήπαρ (η μετατροπή αυτή μπορεί να συμβεί και σε μικρότερη κλίμακα στο έντερο και στους νεφρούς) και να απελευθερωθεί στην κυκλοφορία του αίματος[46].

Η ρύθμιση των διεργασιών του μεταβολισμού του γλυκογόνου είναι αρκετά πολύπλοκη και λαμβάνουν μέρος σε αυτήν διάφορα ένζυμα, τα οποία αποκρίνονται αλλοστερικά σε μεταβολίτες που σηματοδοτούν τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Όταν μιλάμε για αλλοστερικά ένζυμα, είναι ένζυμα τα οποία δεν υπακούουν στην κινητική *Michaelis-Menten* καθώς διαθέτουν πολλές θέσεις πρόσδεσης μορίων πέρα από το ενεργό τους κέντρο και η διαμόρφωσή τους στο χώρο αλλάζει μετά την πρόσδεση των μορίων σε αυτές τις αλλοστερικές θέσεις, ενισχύοντας ή καταστέλλοντας έτσι την δράση τους[46]. Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζεται επίσης και από ορμονικά διεγερόμενους καταρράκτες, οι οποίοι οδηγούν σε αντιστρεπτή φωσφορυλίωση των ενζύμων αλλάζοντας τις κινητικές τους ιδιότητες, οδηγώντας έτσι στην προσαρμογή του μεταβολισμού ανάλογα με τις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού.

Η γλυκονεογένεση και η γλυκόλυση ακολουθούν διαφορετικές πορείες και δεν λειτουργούν με τις ίδιες αντιδράσεις (Εικόνα 6). Η αρχή της αποικοδόμησης του γλυκογόνου σηματοδοτείται από την επινεφρίνη στους μυς και από τη γλυκαγόνη στο ήπαρ, μέσω ειδικών υποδοχέων, προκαλώντας την ενεργοποίηση καταρράκτη κίνησης που οδηγεί στην έναρξη της αποικοδόμησης. Ενώ η σύνθεση του γλυκογόνου ρυθμίζεται από την ινσουλίνη, η οποία αποτελεί το σήμα για καταρράκτη που οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (*PP1*), ενός ενζύμου που διεγείρει την σύνθεση του γλυκογόνου και αναστέλλει τον καταβολισμό του.



Εικόνα 7: Η ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο ήπαρ. Το διάγραμμα σκιαγραφεί την επίδραση του γλυκογόνου στην γλυκογονόλυση και την γλυκονεογένεση. Οι συνολικές κατευθύνσεις των μονοπατιών υποδεικνύονται με βέλη. GCG: γλυκαγόνη, G-1-P: 1-φωσφορική γλυκόζη, G-6-P: 6-φωσφατάση της γλυκόζης, GP: φωσφορυλάση γλυκογόνου, GPK: κινάση φωσφορυλάσης γλυκογόνου, GS: συνθάση γλυκογόνου, GK: κινάση γλυκόζης, HK: εξοκινάση[55].

Το κύριο ένζυμο της αποικοδόμησης είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, η οποία διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ορθοφωσφορικού (P_i) και δίνει G1P[48]. Η GP καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου με τη βοήθεια ενός ενζύμου αποδιακλάδωσης, γιατί δεν μπορεί να διασπάσει τους α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το ένζυμο αποδιακλάδωσης, η γλυκοζιτάση δεσμού α -1,6, σε συνεργασία με μία μεταφοράση μετατρέπουν στην ουσία τη διακλαδισμένη μορφή σε γραμμική επιτρέποντας έτσι την φωσφορυλάση να συνεχίσει τη διάσπαση.

Η παραγόμενη G1P, για να καταφέρει να μετατραπεί G6P και να ακολουθήσει το κύριο μεταβολικό μονοπάτι, χρειάζεται τη δράση ενός ενζύμου που θα μπορεί να μετατοπίσει τη φωσφορική ομάδα. Η μετατόπιση αυτή καταλύεται από την φωσφογλυκομουτάση, ένα ένζυμο που δρα μέσω ανταλλαγής μίας φωσφορικής ομάδας με το υπόστρωμα[46]. Η G6P στην συνέχεια μετατρέπεται σε γλυκόζη με τη δράση της 6-φωσφατάσης της γλυκόζης[55]. η G6P υδρολύεται στο ήπαρ από την φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, ένα ένζυμο που καταλύει την απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας αποδίδοντας ορθοφωσφορικό (P_i) και ελεύθερη γλυκόζη. Αυτό συμβαίνει γιατί η φωσφορυλιωμένη γλυκόζη που

παράγεται από τον μεταβολισμό του γλυκογόνου δεν μπορεί να διαχέεται εύκολα έξω από τα κύτταρα ώστε να εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος.

1.2.3. Η ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση ως μοριακός φαρμακευτικός στόχος

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καθώς και η κινάση της φωσφορυλάσης, αποτελούν τους βασικότερους φαρμακευτικούς στόχους για έναν αριθμό νόσων του μεταβολισμού αλλά κυρίως για τον σακχαρώδη διαβήτη και τον καρκίνο[7]. Ο μη ινσουλινο-εξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης (τύπου 2), υπολογίζεται ότι προσβάλλει εκατομμύρια ανθρώπων ανά τον κόσμο και είναι μία χρόνια μεταβολική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από ελλειμματική απόκριση και ενεργοποίηση της ινσουλίνης (στα άτομα που πάσχουν από τη νόσο παρουσιάζεται αυξημένη ποσότητα γλυκόζης στο αίμα και σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης). Ο διαβήτης τύπου 2 μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές όπως νευροπάθεια, νεφροπάθεια, αμφιβληστροειδοπάθεια, πρόωρη αθηροσκλήρωση και καρδιαγγειακές ασθένειες. Παρ' ότι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες συνδέονται με την εμφάνιση του διαβήτη τύπου 2, η μοριακή βάση της ασθένειας παραμένει ελάχιστα κατανοητή. Ωστόσο υπέρμετρη παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ κλιμακώνεται στον διαβήτη τύπου 2 και αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες που συνεισφέρουν στην υπεργλυκαιμία[6]. Η συσσώρευση δεδομένων υποστηρίζει έντονα ότι ο αυστηρός έλεγχος της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος είναι κρίσιμος, ώστε αποφευχθεί ή να καθυστερήσει η εμφάνιση των επιπλοκών που σχετίζονται με το σακχαρώδη διαβήτη[56].

Η διατήρηση του ελέγχου των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, είναι κρίσιμη για την ελαχιστοποίηση των επιπτώσεων που προκαλεί ο διαβήτης τύπου 2 και για αυτό η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο φαρμακευτικό στόχο. Η ρύθμιση του ενζύμου μέσω φαρμακευτικών αγωγών, στηρίζεται στον σχεδιασμό ουσιών που θα έχουν την ικανότητα να δρουν ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και κατά συνέπεια και ως αναστολείς της γλυκογονόλυσης. Η ανακάλυψη τέτοιων φαρμάκων αποτελεί μία συνεχή πρόκληση και στηρίζεται σε μελέτες που αφορούν την κρυσταλλική δομή τόσο της ενεργής όσο και της ανενεργής μορφής του ενζύμου. Πληθώρα δεδομένων υψηλής ανάλυσης της δομής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (στην *Protein Data Bank* έχουν κατατεθεί δομές που ο αριθμός τους πλησιάζει τις 200) έχουν πυροδοτήσει τις προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων αναστολέων βασιζόμενων στη δομή του ενζύμου. Η αποτελεσματικότητα τέτοιων ουσιών έχει επιβεβαιωθεί από

μελέτες σε κύτταρα *ex vivo* καθώς και σε πειραματόζωα, επικυρώνοντας έτσι την φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως έναν σημαντικό στόχο για τον σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων[7].

1.2.4. Νόσοι σχετιζόμενοι με την αποθήκευση γλυκογόνου

Έχουν παρατηρηθεί δύο νόσοι που σχετίζονται με τη μειωμένη δράση της *GP*, νόσος *McArdle* (Τύπου V) και νόσος *Hers* (Τύπου VI). Η νόσος Τύπου V, οφείλεται σε μειωμένη δραστηριότητα της *GP*, λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο *PYGM* που κωδικοποιεί την ισομορφή της μυϊκής φωσφορυλάσης. Σε όσους νοσούν, η ελλατωματική γλυκογονόλυση στους σκελετικούς μυς, οδηγεί σε περιορισμό της γλυκόζης όταν αρχίζει η σύσπαση των μυών. Σαν αποτέλεσμα προκαλούνται κράμπες, επέρχεται κόπωση και αυξάνεται ο καρδιακός ρυθμός[57]. Τα κύτταρα των ασθενών με νόσο *McArdle*, κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης γίνονται πιο αλκαλικά σε σχέση με αυτά των φυσιολογικών ατόμων και αυτό οφείλεται στην αποικοδόμηση της φωσφοκρεατίνης. Δεν παρατηρείται συσσώρευση γαλακτικού οξέος, καθώς ο ρυθμός γλυκόλυσης είναι πολύ χαμηλότερος, και το γλυκογόνο δεν μπορεί να κινητοποιηθεί[46].

Η νόσος Τύπου VI είναι μία αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή, που προκαλεί απώλεια της δραστηριότητας της *GP* λόγω μεταλλάξεων που έχουν συμβεί στο γονίδιο *PYGL*, που κωδικοποιεί την ισομορφή της *HGP*[58]. Είναι μία σπάνια διαταραχή και συνήθως εμφανίζει ήπια κλινικά χαρακτηριστικά. Η αύξηση της γλυκόζης στο αίμα, σαν απόκριση στην γλυκαγόνη είναι απύσχα προκαλώντας έτσι υπογλυκαιμία. Η θεραπεία δεν συνιστά φαρμακευτική αγωγή, παρά μόνο να αποφεύγεται μεγάλο χρονικό διάστημα νηστείας[57].

Γενικότερα ο μεταβολισμός του γλυκογόνου αποτελεί βασικό κομμάτι για τους ζώντες οργανισμούς και συνεπώς οποιαδήποτε διαταραχή σε κάποια από τα στάδια του μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές ασθένειες. Η ομοιόσταση της γλυκόζης στο αίμα θα έχει διαταραχθεί, έχοντας σαν αποτέλεσμα σοβαρές συνέπειες. Τα μεγαλύτερα προβλήματα σχετίζονται με αδυναμία του οργανισμού να αποθηκεύσει κατάλληλα το γλυκογόνο. Μέχρι στιγμής έχουν χαρακτηριστεί οχτώ ασθένειες που σχετίζονται με την αποθήκευση του γλυκογόνου. Η πρώτη νόσος (Τύπος I) περιγράφηκε από τον *Edgar von Gierke* το 1929. Η ενζυμική βλάβη σε αυτή τη νόσο ανακαλύφθηκε το 1952 από τον *Carl* και την *Getty Cori* που ανακάλυψαν ότι η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης απουσίαζε από το ήπαρ ενός ασθενή που έπασχε από τη συγκεκριμένη νόσο. Ήταν η πρώτη απόδειξη κληρονομικής ανεπάρκειας

ενός ενζύμου του ήπατος. Η ασθένεια αυτή μπορεί να προκληθεί και από μία μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικεύει τον μεταφορέα της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Στη δεδομένη νόσο η δομή του γλυκογόνου είναι φυσιολογική αλλά απαντάται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Αυτό συμβαίνει γιατί με την απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης δεν μπορεί να παραχθεί γλυκόζη από την 6-φωσφορική γλυκόζη, με αποτέλεσμα αυτό το φωσφορυλιωμένο ένζυμο να συσσωρεύεται στο ήπαρ καθώς δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και να οδηγήσει σε αύξηση της γλυκόλυσης στο ήπαρ και άρα σε αύξηση των επιπέδων γαλακτικού και πυροσταφυλικού στο αίμα[46].

Στον Τύπο II, νόσος *Pompe*, λείπει το ένζυμο γλυκοζιτάση α -1,4 και τα λυσοσώματα γεμίζουν με γλυκογόνο, με κανονική δομή μεν αλλά σε πολύ αυξημένη ποσότητα. Επηρεάζει όλα τα όργανα του οργανισμού και οι ασθενείς συνήθως πεθαίνουν πριν συμπληρώσουν τα δύο χρόνια ζωής. Στον Τύπο III, νόσος *Cori*, δεν υπάρχει ένα ένζυμο κατάργησης διακλαδώσεων η άμυλο-1,6-γλυκοζιτάση με αποτέλεσμα το γλυκογόνο να έχει μικρές εξωτερικές διακλαδώσεις και βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα. Είναι μία ασθένεια που επηρεάζει τους μύες και το ήπαρ. Αντίθετα στον Τύπο IV που είναι γνωστός ως νόσος *Andersen*, λείπει το ένζυμο σχηματισμού των διακλαδώσεων και το γλυκογόνο βρίσκεται σε κανονικές ποσότητες αλλά με πολύ επιμήκεις εξωτερικές διακλαδώσεις. Η ασθένεια αυτή προσβάλλει το ήπαρ και τον σπλήνα και οδηγεί σε σταδιακή κίρρωση του ήπατος και τελικά σε θάνατο πριν την συμπλήρωση των δύο ετών. Σε δύο ακόμα τύπους, VII και VIII, η δομή του γλυκογόνου είναι κανονική αλλά η συγκέντρωσή του είναι σε υψηλά επίπεδα. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη των ενζύμων φωσφωφρουκτοκινάση και κινάση της φωσφορυλάσης αντίστοιχα[46].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Γνωρίζοντας ότι η απόκτηση μεγάλων ποσοτήτων και υψηλής καθαρότητας πρωτεϊνών αποτελεί πρωταρχικό και βασικό στάδιο για περαιτέρω μελέτες, της Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, στην παρούσα διατριβή επιχειρήθηκε η διερεύνηση μιας μεθοδολογίας και ο σχεδιασμός ενός βελτιωμένου πρωτοκόλλου έκφρασης που θα μπορεί να εφαρμόζεται σε περιπτώσεις απαιτητικών πρωτεϊνών. Σαν πρωτεΐνη στόχος επιλέχθηκε η ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*hIGP*) που είναι ένα μεγάλο μόριο της τάξεως των 97,5 KD και παρουσιάζει αρκετά προβλήματα κατά τη διαδικασία της υπερέκφρασης, της απομόνωσης και του καθαρισμού. Σκοπός ήταν η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου έκφρασης της *hIGP* ώστε να αυξηθεί η ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό δοκιμάστηκαν πολλές διαφορετικές συνθήκες έκφρασης, τόσο σε διαφορετικές σειρές κυττάρων όσο και σε διάφορες θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις επαγωγής, καθώς επίσης και προσπάθεια συνέκφρασης με κάποιο μοριακό συνοδό (*molecular chaperones GroES, GroEL, DnaK, DnaJ and GrpE*). Τέλος πραγματοποιήθηκε ανάλυση των ποσοστών των σπάνιων κωδικωνίων στο γονίδιο της πρωτεΐνης (*PYGL*) και έγινε αντιληπτό ότι περιέχει μεγάλο αριθμό τριπλετών που δεν εκφράζονται εύκολα από το σύστημα *Escherichia coli*. Χρησιμοποιώντας αλγορίθμους για βελτιστοποίηση κωδικωνίων αναβαθμίστηκε η σχέση προσαρμογής του γονιδίου με τις απαιτήσεις του συστήματος έκφρασης έχοντας σαν τελικό στόχο την υπερέκφρασή της.

3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά

3.1.1. Αντιδραστήρια

Acetic Acid	Merck
Acrylamide	SERVA
Ammonium Persulfate (APS)	SIGMA
Ampicillin	SERVA
N'N' methylene- bis Acrylamide	SERVA
Bacto-tryptone	Fluka
Chloramphenicol	SIGMA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Merck
Ethanol Absolute	SIGMA

Glycerol	Applichem
Glycine	SERVA
Hydrochloric Acid (HCl)	Merck
Imidazole	SIGMA
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Serva
Kanamycin	Applichem
LB Broth	Applichem
LB Agar	SIGMA
Magnesium Powder	MERCK
Manganese Chloride (MnCl ₂)	SIGMA
Methanol	Applichem
Pink prestained protein marker	Nippon Genetics
PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)	Applichem
Pyridoxine	SIGMA
SDS (Sodium dodecyl Sulfate)	SERVA
Sodium Chloride (NaCl)	Applichem
Sodium diHydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	Invitrogen
Tris Base	Applichem
Agarose	SIGMA
β- Mercaptoethanol	Riedel de Haën
Yeast extract	SERVA

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είχαν τη μέγιστη χημική καθαρότητα.

Βακτηριακά στελέχη

3.1.1.1. Βακτηριακά στελέχη για την υπερέκφραση πρωτεϊνών

BL21- Gold (DE3)	Agilent Technologies
Rosetta 2	Novagen
B834 (DE3)	Novagen
B834(DE3)pLysS	Novagen
Origami 2	Novagen

Η σειρά κυττάρων *BL21- Gold (DE3)* είναι ειδική για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς χρησιμοποιούν τον εκκινητή της *T7 RNA* πολυμεράσης για άμεση έκφραση σε υψηλά επίπεδα. Είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να απουσιάζουν οι πρωτεάσες *Lon* και *OmpT* που θα μπορούσαν να υποβιβάσουν την έκφραση[59]. Επίσης περιέχουν επιπλέον κωδικώνια που σπάνια χρησιμοποιούνται από την *E.coli* επιτρέποντας έτσι την έκφραση πρωτεϊνών με μεγάλο ποσοστό *rare codon*. Ο ίδιος σχεδιασμός ισχύει και για τα *Rosetta 2*, τα οποία περιέχουν ένα επιπλέον πλασμίδιο το *pRARE2* που παρέχει *tRNAs* για 7 επιπλέον σπάνια κωδικώνια[60].

Τα *B834 (DE3)* και *B834(DE3)pLysS* είναι βακτηριακά στελέχη που αδυνατούν να συνθέσουν το αμινοξύ Μεθειονίνη και φέρουν ειδικές μεταλλάξεις στο γένωμα τους, οι οποίες επιτρέπουν την επισήμανση των πρωτεϊνών στόχων με ³⁵S-μεθειονίνη σε υψηλά επίπεδα ειδικής δραστηριότητας καθιστώντας τα κατάλληλα για κρυσταλλογραφία[61]. Τα *B834(DE3)pLysS* επιπρόσθετα εκφράζουν την *T7* λυσοζύμη η οποία καταστέλλει τη βασική έκφραση της *T7 RNA* πολυμεράσης πριν την επαγωγή, σταθεροποιώντας έτσι τους πλασμιδιακούς φορείς *pET* βελτιώνοντας έτσι την ανάπτυξη και βιωσιμότητα των κυττάρων[60].

Τα βακτηριακά στελέχη *Origami* είναι K-12 παράγωγα και φέρουν μεταλλάξεις σε αμφότερα τα γονίδια της αναγωγάσης θειορεδοξίνης (*trxB*) και αναγωγάσης γλουταθειόνης (*Gor*) , οι οποίες βοηθούν σε σημαντικό επίπεδο τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών στο κυτταρόπλασμα της *E.coli*[60]. Το χαρακτηριστικό αυτό τα καθιστά ιδανικά για ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που εμφανίζουν πρόβλημα στην σωστή αναδίπλωσή τους καθώς δεν μπορούν να σχηματιστούν οι απαραίτητοι δισουλφιδικοί δεσμοί.

3.1.1.2. Βακτηριακά στελέχη για κλωνοποίηση και υπερέκφραση πλασμιδιακών φορέων

XL1-Blue

Agilent Technologies

Το στέλεχος αυτό είναι ειδικά τροποποιημένο ώστε να είναι ελεύθερο ενδονουκλεασών (*endA*) βελτιώνοντας έτσι την απόδοση του μετασχηματισμού και την αναπαραγωγή των πλασμιδιακών φορέων.

3.1.2. Πλασμιδιακοί φορείς

pETM-11

EMBL

pDEST-14

Invitrogen

pG-KJE8

Takara

pGro7

Takara

pKJE7

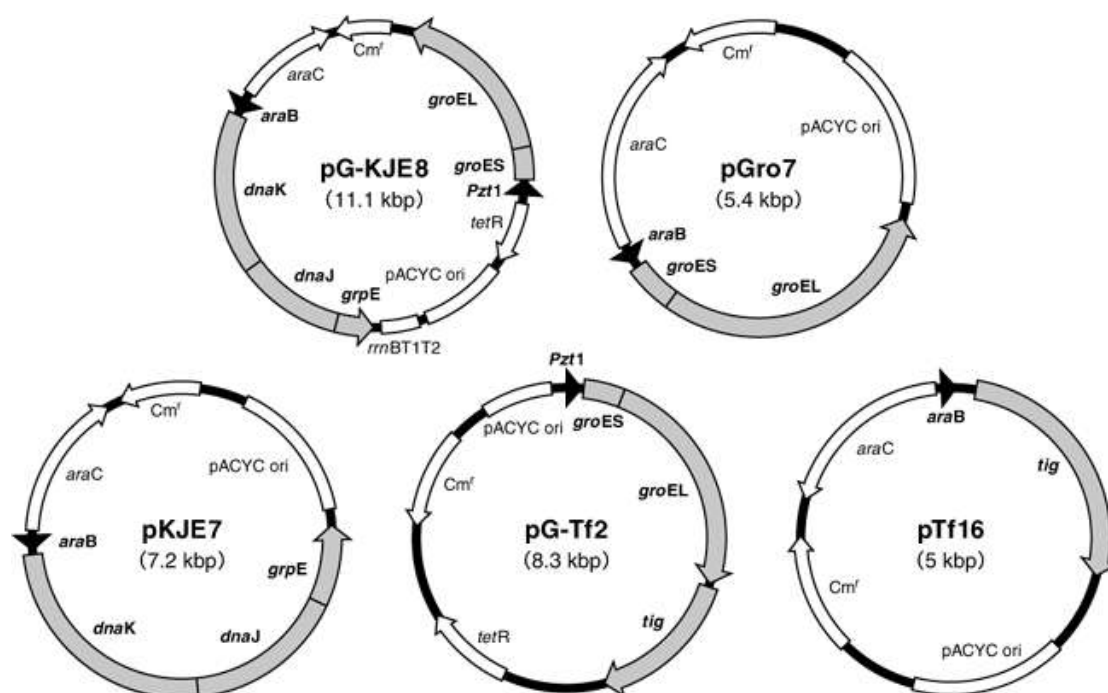
Takara

pG-Tf2

Takara

Ο πλασμιδιακός φορέας *pET-M11* χρησιμοποιεί ως εκκινητή τον *T7-lac* και φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας σε Καναμυκίνη. Είναι ειδικός πλασμιδιακός φορέας για την έκφραση πρωτεϊνών συζευγμένων με έξι ιστιδίνες (*His-tag*) και φέρει αλληλουχία αναγνώρισης για την πρωτεάση *TEV* που βοηθάει στην απομόνωση της πρωτεΐνης στόχου.

Τα πλασμίδια *pG-KJE8*, *pGro7*, *pKJE7*, *pG-Tf2* και *pTf16* αποτελούν μέρος του *Chaperone plasmid set*(Takara) και αναπτύχθηκαν από το *HSP Research Institute, Inc.*[40]. Είναι πλασμίδια ειδικά διαμορφωμένα να εκφράζουν μοριακούς συνοδούς συμβάλλοντας στην σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης στόχου. Το *pG-KJE8* εκφράζει τα *chaperones dnaK-dnaJ-dnaE*, *groES-groEL*. Ως εκκινητή χρησιμοποιεί τους *araB* και *Pzt-1* και επάγεται από την προσθήκη L-αραβινόζης. Το *pGro7* εκφράζει τα *chaperones groES-groEL*, χρησιμοποιεί για εκκινητή τον *araB* και επάγεται από την προσθήκη L-αραβινόζης. Το *pKJE7* εκφράζει τα *chaperones dnaK-dnaJ-dnaE* και έχει ως εκκινητή τον *araB*. Και αυτό επάγεται με την προσθήκη L-αραβινόζης. Το *pG-Tf2* εκφράζει τα *chaperones groES-groEL*, εκκινητής είναι ο *Pzt-1* και επάγεται με την προσθήκη τετρακυκλίνης. Τέλος το *pTf16* εκφράζει το μοριακό συνοδό *tig*, χρησιμοποιεί για εκκινητή τον *araB* και επάγεται με την προσθήκη L-αραβινόζης.



Εικόνα 8: Χάρτες των πλασμιδίων (chaperones) pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2 και pTf16 που εκφράζουν τους μοριακούς συνοδούς dnaK-dnaJ-dnaE, groES-groEL και tig^[40].

3.1.3. Ένζυμα

Benzonase	Merck- Millipore
-----------	------------------

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα *NcoI* και *XhoI* καθώς κρίθηκαν ότι είναι τα καταλληλότερα για να εισαχθεί το επιθυμητό γονίδιο στον πλασμιδιακό φορέα *pET-M11* καθώς αναγνωρίζουν τις αλληλουχίες 5'...CCATGG...3' και 5'...CTCGAG...3' αντίστοιχα, και πρόκεινται για αλληλουχίες που δεν απαντώνται στο εισερχόμενο γονίδιο.

3.1.4. Δείκτες μοριακών βαρών

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas
PiNK prestained protein marker	Nippon Genetics

3.1.5. Υγρή χρωματογραφία

HisTrap HP (Ni Sepharose)	GE Healthcare
Protino Ni-NTA Agarose	Macherey-Nagel
Vivaspin 4 (30000 cutoff)	Sartorius stedim
Μεμβράνη διαπίδυσης (10000 cutoff)	SIGMA

3.1.6. Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής

Resource Q	GE Healthcare
------------	---------------

3.1.7. Διαλύματα

3.1.7.1. Ρυθμιστικά διαλύματα λύσης βακτηριακών κυττάρων με χρήση υπερήχων

- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 1: 0.02M Hepes buffer (pH 6.8), 0,5M NaCl, 0.1% Triton X, 0.01M PMSF, διαλύονται σε dH₂O. Η προσθήκη του αναστολέα των πρωτεασών PMSF γίνεται λίγο πριν τη χρήση του διαλύματος.
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 2: 0.02M Hepes buffer (pH 7.5), 0,5M NaCl, 0.1% Triton X, 0.01M PMSF, διαλύονται σε dH₂O.
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 3: 0.02M Tris buffer (pH 8.2), 0.2M NaCl, 0.1% Triton X, 0.01M PMSF, διαλύονται σε dH₂O.
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 4: 0.02M Hepes buffer (pH 7.5), 0,5M NaCl, 0.1% Triton X, 0.01M PMSF, 5mM 2-mercaptoethanol, διαλύονται σε dH₂O.

3.1.7.2. Ρυθμιστικά διαλύματα βελτίωσης διαλυτότητας(1ο)

- pH:

pH 5.5	0.05M Na Acetate buffer, 0.05M NaCl, 0.005M EDTA
pH 6.5	0.05M MES buffer, 0.05M NaCl, 0.005M EDTA
pH 7.5	0.05M Tris buffer, 0.05M NaCl, 0.005M EDTA
pH 8.5	0.05M Tris buffer, 0.05M NaCl, 0.005M EDTA
Ph 9.5	0.05M Tris buffer, 0.05M NaCl, 0.005M EDTA

Διαλυτοποιούνται σε dH₂O και ρυθμίζεται ανάλογα το pH (η παρασκευή βασίστηκε στο πρωτόκολλο Preparation of soluble/insoluble proteins from cells του EMBL).

- Συγκέντρωση άλατος:

0.1S	0.05M Tris buffer (pH 7.5), 0.1M NaCl, 0.005M EDTA
0.5S	0.05M Tris buffer (pH 7.5), 0.5M NaCl, 0.005M EDTA
1S	0.05M Tris buffer (pH 7.5), 1M NaCl, 0.005M EDTA
0.1KS	0.05M Tris buffer (pH 7.5), 0.1M KCl, 0.005M EDTA

1KS	0.05M Tris buffer (pH 7.5), 1M KCl, 0.005M EDTA
-----	---

Διαλυτοποιούνται σε dH₂O και ρυθμίζεται ανάλογα το pH (η παρασκευή βασίστηκε στο πρωτόκολλο Preparation of soluble/insoluble proteins from cells του EMBL).

▪ Συγκέντρωση ουρίας:

0.5U	0.05M Tris buffer (pH 7.5), 0.5M Urea, 0.05M NaCl, 0.005M EDTA
1U	0.05M Tris buffer (pH 7.5), 1M Urea, 0.05M NaCl, 0.005M EDTA
2U	0.05M Tris buffer (pH 7.5), 2M Urea, 0.05M NaCl, 0.005M EDTA
3U	0.05M Tris buffer (pH 7.5), 3M Urea, 0.05M NaCl, 0.005M EDTA
4U	0.05M Tris buffer (pH 7.5), 4M Urea, 0.05M NaCl, 0.005M EDTA
5U	0.05M Tris buffer (pH 7.5), 5M Urea, 0.05M NaCl, 0.005M EDTA
6U	0.05M Tris buffer (pH 7.5), 6M Urea, 0.05M NaCl, 0.005M EDTA

Διαλυτοποιούνται σε dH₂O και ρυθμίζεται ανάλογα το pH (η παρασκευή βασίστηκε στο πρωτόκολλο Preparation of soluble/insoluble proteins from cells του EMBL).

▪ Είδος αποδιατακτικού:

X	0.2M Tris-HCl buffer (pH 7.5), 0.05M NaCl, 0.2% triton X-100
T	0.2M Tris-HCl buffer (pH 7.5), 0.05M NaCl, 0.2% Tween-20

Διαλυτοποιούνται σε dH₂O και ρυθμίζεται ανάλογα το pH (η παρασκευή βασίστηκε στο πρωτόκολλο Preparation of soluble/insoluble proteins from cells του EMBL).

▪ Συγκέντρωση σταθεροποιητή:

10G	0.02M Tris-HCl (pH7.5), 0.05M NaCl, 10% glycerol
50G	0.02M Tris-HCl (pH7.5), 0.05M NaCl, 50% glycerol

Διαλυτοποιούνται σε dH₂O και ρυθμίζεται ανάλογα το pH (η παρασκευή βασίστηκε στο πρωτόκολλο Preparation of soluble/insoluble proteins from cells του EMBL).

3.1.7.3. Ρυθμιστικά διαλύματα βελτιστοποίησης διαλυτότητας (2ο)

▪ pH 6,8:

1°	0.02M Hepes buffer, 10mM 2-mercaptoethanol, 1mM PMSF
2°	0.02M Hepes buffer, 10mM 2-mercaptoethanol, 1mM PMSF , 10% Glycerol
3°	0.02M Hepes buffer, 10mM 2-mercaptoethanol, 1mM PMSF , 0.1M NaCl
4°	0.02M Hepes buffer, 10mM 2-mercaptoethanol, 1mM PMSF, 0.1% Triton-X
5°	0.02M Hepes buffer, 10mM 2-mercaptoethanol, 1mM PMSF, 0.1% Tween-20
6°	0.02M Hepes buffer, 10mM 2-mercaptoethanol, 1mM PMSF , 1M Urea

▪ pH 7,5:

1°	0.05M Tris buffer, 0.5M NaCl, 5mM 2-mercaptoethanol, 1mM PMSF
----	---

▪ pH 8,2:

1°	0.05M Tris buffer, 1mM PMSF
2°	0.05M Tris buffer, 1mM PMSF, 10% Glycerol
3°	0.05M Tris buffer, 1mM PMSF, 0.1M NaCl
4°	0.05M Tris buffer, 1mM PMSF, 0.1% Triton-X
5°	0.05M Tris buffer, 1mM PMSF, 0.1% Tween-20
6°	0.05M Tris buffer, 1mM PMSF, 1M Urea

3.1.7.4. Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (100mM)

58mM Na₂HPO₄, 42mM NaH₂PO₄, διαλυτοποιούνται σε dH₂O και το pH ρυθμίζεται έως 7

3.1.7.5. Ρυθμιστικά διαλύματα Υγρής χρωματογραφίας

- Χρωματογραφία Συγγένειας (Ni+2 Sepharose, GE Healthcare):
 - Ρυθμιστικό διάλυμα εξισσορόπησης στήλης: 20mM Phosphate buffer 2° (pH 7), 500mM NaCl, 20mM Imidazole
 - Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης: 20mM Phosphate buffer 2° (pH 7), 500mM NaCl, 500mM Imidazole
- Μεσαίας κλίμακας απομόνωση με σφαιρίδια Ni-NTA Agarose :
 - Ρυθμιστικό διάλυμα εξισσορόπησης στήλης A: 0.02M Hepes buffer (pH 7.5), 0.5M NaCl, 0.1% Triton-X, 1mM PMSF,
 - Ρυθμιστικό διάλυμα εξισσορόπησης στήλης B: 0.02M Hepes buffer (pH 7.5), 0.5M NaCl, 0.1% Triton-X, 1mM PMSF, 250mM Imidazole

3.1.7.6. Dialysis buffer

20mM Tris buffer (pH 8), 1mM DTT, ρυθμίζεται το pH και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C. Χρησιμοποιείται για την αλλαγή του pH του διαλύματος. Το δείγμα τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης και στη συνέχεια μέσα στο dialysis buffer. Αναδεύονται 12-16 ώρες ώστε η αλλαγή του buffer μέσω των πόρων της μεμβράνης να γίνει σταδιακά.

3.1.7.7. Ρυθμιστικά διαλύματα χρωματογραφίας ιονανταλλαγής

- Χρωματογραφία ιονανταλλαγής (Resource Q)
 - Ρυθμιστικό διάλυμα A: 20mM Tris buffer (pH 8), 1mM DTT
 - Ρυθμιστικό διάλυμα B: 20mM Tris buffer (pH 8), 1M NaCl, 1mM DTT

Διαλυτοποιούνται με dH₂O και ρυθμίζεται το pH με HCl 10M. Φιλτράρονται και απαερώνονται με υπέρηχους. Θερμοκρασία στους 4°C.

3.1.7.8. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE (Running Buffer) 10×

250mM Tris, 1.92M Glycine, 35mM SDS. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την παρασκευή Running Buffer 1× 1L: 100mL Running Buffer 10× και αραιώση με 900mL dH₂O. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. Δεν χρειάζεται ρύθμιση του pH.

3.1.7.9. Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων SDS-PAGE 4× (Sample Buffer)

500mM Tris-HCl pH 6.8, 40% Glycerol, 8% SDS, 5% β- mercaptoethanol, 0.04% Bromophenol Blue. Διατηρείται στους -20°C.

Το Tris-HCl διατηρεί το pH του συνολικού διαλύματος. Το SDS (Sodium dodecyl sulfate) είναι μία ανιονική επιφανειοδραστική ουσία και αποτελεί το κύριο αποδιατακτικό παράγοντα που θα αποδιατάξει τη δευτεροταγή και την τριτοταγή δομή (που δεν αποτελείται από δισουλφιδικούς δεσμούς). Επιπροσθέτως θα αποδώσει στις πρωτεΐνες ένα ενιαίο αρνητικό φορτίο ανάλογο της μάζας κάθε πρωτεΐνης[62]. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί ανάγονται από την προσθήκη της β-μερκαπτοαιθανόλης, η οποία εμποδίζει την αναδίπλωση εκ νέου της πρωτεΐνης. Η πλήρης αποδιάταξη πραγματοποιείται με βρασμό των δειγμάτων στους 94-95°C. Το κυανό της βρομοφαινόλης προστίθεται ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης, καθώς έχει ταχύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα από τις ηλεκτροφορούμενες πρωτεΐνες[63].

3.1.7.10. Διάλυμα χρώσης πηκτής πολυακρυλαμίδιου

Χρώση με Coomassie: 10% Acetic Acid, Coomassie Blue 0.05% (40% Methanol, 10% Acetic Acid, dH₂O, Coomassie Blue R-250 ~0.1%). Το διάλυμα αναδεύεται και πριν την χρήση διηθείται για απομάκρυνση τυχόν συσσωματωμάτων από το Coomassie Blue R-250. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. Η χρωστική προσδένεται μη ειδικά με όλες τις πρωτεΐνες, η πηκτή επωάζεται μαζί με τη χρωστική και όση δεν έχει προσδεθεί απομακρύνεται στα επόμενα βήματα της χρώσης. Τέλος παραλαμβάνουμε την επιθυμητή εικόνα των ηλεκτροφορημένων πρωτεϊνών.

3.1.7.11. Ρυθμιστικό διάλυμα για ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 50×:

24.2% Tris base, 5.71% ακετοξικό οξύ, 0.05M EDTA (pH 8.6)

3.1.7.12. Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων ηλεκτροφόρησης αγαρόζης 6×

0.09% Bromophenol Blue, 0.09% Xylene Cyanol, 60% Γλυκερόλη, 60mM EDTA

3.1.8. Οργανολογία

ÄKTA purifier (FPLC system)	GE Healthcare Life Sciences
Αυτόματες πιπέτες	Gilson,
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini PROTEAN® Tetra Cell	BioRad
Μετρητής pH	Metrohm
Φυγόκεντροι	Cambridge eppendorf Centrifuge 5810R Hermle Z36HK
Φασματοφωτόμετρο ορατού- υπεριώδους UV 1600-PC	VWR
Heat Block	Thermoleader

Τα όργανα ήταν κατά κύριο λόγο διαθέσιμα στο Εργαστήριο Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς επίσης και στους κοινόχρηστους χώρους του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Παρασκευή επιδεκτικών προς χημικό μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων

Μετασχηματισμός ονομάζεται η πρόσληψη και ενσωμάτωση εξωγενούς *DNA* από το βακτηριακό γονιδίωμα. Ο μετασχηματισμός ανάλογα με το είδος του οργανισμού μπορεί να γίνει αυθόρμητα. Στην περίπτωση της *E.coli* όμως αυτό δεν συμβαίνει και κατά συνέπεια πρέπει να γίνει κάποια εξωτερική παρέμβαση. Η επώαση με Ca^{2+} καθιστά την εξωτερική μεμβράνη της *E.coli* αντιστρεπτά διαπερατή σε μακρομόρια μέσω πλασμόλυσης. Παρουσία του CaCl_2 , αυξάνονται τα επίπεδα κάποιων πορινών όπως η *OmpC*, *OmpA* κ.α.[64] οι οποίες έχουν οσμωρυθμιστικό ρόλο στους προκαρυώτες[64],[65],[66]. Η πλασμόλυση που

συμβαίνει παρουσία του CaCl_2 είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού[64],[66].

Από μια καλλιέργεια που έχει μεγαλώσει όλη τη νύχτα (στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση στις 210rpm) σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο και παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού, εμβολιάζονται σε τελική συγκέντρωση 1/100 σε 200mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) και παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά λαμβάνοντας 1mL καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι να φτάσει να έχει $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.5-0.7$ A, όπου και θεωρείται πως η καλλιέργεια θα βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Όταν λοιπόν η απορρόφηση έχει φτάσει στα επιθυμητά *Abs*, το σύνολο της καλλιέργειας φυγοκεντρείται σε παγωμένους σωλήνες τύπου falcon των 50mL, στις 4000rpm για 6min στους 4°C και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο για 14 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε παγωμένο διάλυμα 0.1M CaCl_2 και αφήνεται για 20min στον πάγο. Εν συνεχεία, φυγοκεντρείται στις 4000rpm για 6min στους 4°C και επαναδιαλύεται εκ νέου σε παγωμένο διάλυμα 0.1M CaCl_2 και αφήνονται στον πάγο για 12-16h. Τέλος, τα βακτήρια αραιώνονται σε γλυκερόλη (10% τελική συγκέντρωση), διαμοιράζονται σε σωλήνες τύπου erppendorf σε κλάσματα των 100μL και αποθηκεύονται στους -80°C μετά από ταχεία ψύξη (flash freeze) σε παγωμένη αιθανόλη 100% (-80°C). Σημειώνεται ότι όλοι οι χειρισμοί πλην της επώασης γίνονται σε ψυχρό θάλαμο ($+4^\circ\text{C}$) και πάγο, με αποστειρωμένα υλικά και εργαλεία σε στείρες συνθήκες.

3.2.2. Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα (χημικός μετασχηματισμός)

Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός σε κυτταρικές σειρές BL21- Gold (DE3), Rosetta 2, B834 (DE3), B834(DE3)pLysS, Origami 2 και XL-1Blue. Η διαδικασία βασίζεται στη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock) κατά την οποία τα επιδεκτικά σε ξένο DNA κύτταρα υποβάλλονται για σύντομο χρονικό διάστημα σε υψηλή θερμοκρασία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ανοίγουν οι πόροι της μεμβράνης και το επιθυμητό πλασμίδιο να εισέρχεται πιο εύκολα στο κύτταρο. Τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα είναι αποθηκευμένα σε σωληνάρια τύπου erppendorf και διατηρούνται σε πάγο. Προσθέτουμε 50ng πλασμιδίου, αναδεύουμε απαλά και επωάζουμε σε πάγο (0°C) για 30min. Μετά το πέρας της μισής ώρας επωάζονται στο *heat block* στους 42°C αυστηρά για 45sec και στη συνέχεια μεταφέρονται σε πάγο (4°C) για 2 min. Εφόσον περάσουν τα 2 min προστίθεται

αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο χωρίς να περιέχει αντιβιοτικό, μέχρι τελικού όγκου 1 mL. Τα μετασχηματισμένα πλέον βακτηριακά κύτταρα επωάζονται στην συνέχεια για 1h στους 37°C και υπό συνεχή ανάδευση (180-210rpm). Μετά το πέρας της 1h επώασης η υγρή καλλιέργεια επιστρώνεται με γυαλίνο διανομέα και σε αναλογία 1/500, σε τρυβλία petri με θρεπτικό μέσο LB Agar στα οποία έχει προηγουμένως προστεθεί το ανάλογο αντιβιοτικό. Τα τρυβλία επωάζονται για 14-16h σε ξηρό θερμαινόμενο θάλαμο θερμοκρασίας 37°C. Όλοι οι χειρισμοί και όλες οι διαδικασίες γίνονται υπό στείρες συνθήκες.

3.2.3. Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα (*electroporation*)

Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηριακών συστημάτων έκφρασης που εκφράζουν τους μοριακούς συνοδούς (*chaperones*) DnaK-DnaJ-GrpE, GroEL-GroES και tig με τη μέθοδο ηλεκτροδιάτρησης (*electroporation*). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα κύτταρα με σκοπό να αυξηθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης, επιτρέποντας έτσι την είσοδο εξωγενούς DNA. Ο ηλεκτρικός παλμός εφαρμόζεται στον βέλτιστο αριθμό Volt και μόνο για κλάσματα του δευτερολέπτου. Αυτό είναι αρκετό για να διαταραχθεί η φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης και να δημιουργηθούν προσωρινοί πόροι. Το ηλεκτρικό δυναμικό της μεμβράνης αυξάνεται επιτρέποντας έτσι σε φορτισμένα μόρια όπως το DNA να οδηγηθούν κατά μήκος της μεμβράνης και δια μέσου των πόρων[67]. Τα ειδικά διαμορφωμένα κύτταρα βρίσκονται αποθηκευμένα σε σωληνάρια τύπου *erppendorf* και διατηρούνται στους -80°C. Προσθέτουμε 50ng πλασμιδίου, αναδεύουμε απαλά και επωάζουμε σε πάγο (0°C) για 30min. Μετά το πέρας της μισής ώρας εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο λίγων Volt κατάλληλων για το βακτήριο *E.coli* για κλάσματα του δευτερολέπτου με ειδική συσκευή ηλεκτροδιάτρησης και αφήνονται για επώαση 2 min σε πάγο (4°C). Εφ' όσον περάσουν τα 2 min προστίθεται αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο άνευ αντιβιοτικού μέχρι τελικού όγκου 1ml. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επωάζονται για 1h στους 37°C και υπό συνεχή ανάδευση (180-210rpm). Μετά το πέρας της 1h επώασης η υγρή καλλιέργεια επιστρώνεται με γυαλίνο διανομέα, σε τρυβλία *petri* με θρεπτικό μέσο LB Agar στα οποία έχει προηγουμένως προστεθεί το ανάλογο αντιβιοτικό. Τα τρυβλία επωάζονται για 14-16h σε ξηρό θερμαινόμενο θάλαμο θερμοκρασίας 37°C. Όλοι οι χειρισμοί και όλες οι διαδικασίες γίνονται υπό στείρες συνθήκες.

3.2.4. Μελέτες έκφρασης της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*hIGPb*)

3.2.4.1. Υγρές καλλιέργειες

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε πολλές διαφορετικές συνθήκες για να διαπιστωθεί η έκφραση της πρωτεΐνης, να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες και για να επιτευχθεί υπερέκφραση και να βελτιωθεί η διαλυτότητά της στην περίπτωση που εκφράζεται σε μορφή έγκλειστων σωμάτων. Εξετάσθηκαν οι κυτταρικές σειρές BL21- Gold (DE3), Rosetta 2, B834 (DE3), B834(DE3)pLysS και Origami 2. Η επαγωγή της υπερέκφρασης έγινε σε διάφορες συγκεντρώσεις επαγωγέα (*IPTG*), σε διάφορες θερμοκρασίες και διαφορετικούς χρόνους. Επίσης πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στις συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων (θρεπτικά μέσα, συγκέντρωση συμπαραγόντα κ.α.) ώστε να διαπιστωθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την καλύτερη ανάπτυξη των βακτηρίων και την μεγαλύτερη απόδοση στην έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

- Ανάπτυξη κυττάρων: Η ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου για να εκφραστεί χρειάζεται τη συνέργεια της πυριδοξίνης και του $MnCl_2$ ή του $MgCl_2$. Η πυριδοξίνη μετατρέπεται ταχέως σε πυριδοξάλη (PLP το ενεργό συνένζυμο για την έκφραση της *hIGP*) με τον σχηματισμό σταθερών βάσεων Schiff. Για την μετατροπή αυτή είναι απαραίτητη η παρουσία ενός δισθενούς ιόντος, κατά προτίμηση Mn^{+2} ή Mg^{+2} . Πραγματοποιήθηκαν πολλές δοκιμές ως προς την συγκέντρωση της πυριδοξίνης, του $MnCl_2$ και του $MgCl_2$ καθώς επίσης δοκιμάστηκαν και διαφορετικά θρεπτικά μέσα.

Οι κυτταρικές σειρές BL21- Gold (DE3), B834 (DE3) και B834(DE3)pLysS αναπτύχθηκαν σε LB Broth (AppliChem), 2YT (με αναλογίες 1.6/100 Bacto-tryptone, 0.5/NaCl και 1/100 Yeast extract και ρύθμιση του pH στο 7) και LB Broth (χειροποίητο με αναλογίες 1/100 Bacto-tryptone, 1/100 NaCl και 0.5/100 Yeast extract και ρύθμιση του pH στο 7). Οι κυτταρικές σειρές Rosetta 2 και Origami 2 αναπτύχθηκαν μόνο σε χειροποίητο LB Broth.

Οι συγκεντρώσεις πυριδοξίνης που δοκιμάστηκαν ήταν 50μg/ml και 100μg/ml. Οι συγκεντρώσεις $MnCl_2$ που δοκιμάστηκαν ήταν 2.4mM, 4.8mM. Και οι

συγκεντρώσεις $MgCl_2$ που δοκιμάστηκαν ήταν 5mM και 10mM. Οι δοκιμές αυτές πραγματοποιήθηκαν στις κυτταρικές σειρές BL21- Gold (DE3), B834 (DE3) και B834(DE3)pLysS και έγιναν είτε μεμονωμένες είτε σε συνδυασμό μεταξύ αυτών των παραγόντων. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε υγρές καλλιέργειες εφόσον είχε προηγηθεί ο αντίστοιχος μετασχηματισμός των βακτηριακών στελεχών με το επιθυμητό πλασμίδιο. Για κάθε υγρή καλλιέργεια γινόταν επιλογή μίας μοναδιαίας στηκτής αποικίας από το ανάλογο τρυβλίο Petri σε σωληνάριο τύπου falcon (θρεπτικό μέσο 5-15 ml) που περιείχε τις αντίστοιχες προς δοκιμή συγκεντρώσεις των ουσιών και αφήνονταν να επωαστούν για 16h στους 37°C και υπό συνεχή ανάδευση (210rpm). Εφόσον υπήρχε ανάπτυξη των κυττάρων επακολουθούσε ανακαλλιέργεια σε μεγαλύτερη κλίμακα (θρεπτικό μέσο 30-60ml) και μετέπειτα πραγματοποιούνταν οι δοκιμές της επαγωγής. Όλοι οι χειρισμοί γίνονται σε στείρες συνθήκες.

Επίσης δοκιμάστηκε η συγκέντρωση της πυριδοξίνης στην κυτταρική σειρά BL 21 Gold σε συγκεντρώσεις 0 $\mu g/ml$, 25 $\mu g/ml$, 50 $\mu g/ml$, 100 $\mu g/ml$ και 200 $\mu g/ml$. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία επαγωγής διαιρώντας τις καλλιέργειες σε "control" που δεν έγινε επαγωγή και σε "0.5" στις οποίες προστέθηκε IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.5mM και σε θερμοκρασίες 37°C και 18°C.

- ο Επαγωγή υπερέκφρασης στους 37 °C: αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB Broth και θρεπτικό μέσο 2YT, στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό (το αντιβιοτικό εξαρτάται από το πλασμίδιο που χρησιμοποιείται κάθε φορά καθώς διαφορετικά πλασμίδια φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε διαφορετικά αντιβιοτικά και οι τελικές συγκεντρώσεις είναι 100 $\mu g/ml$ για ampicillin, 34 $\mu g/ml$ για chloramphenicol, 20 $\mu g/ml$ για kanamycin) εμβολιάστηκαν με 1/100 από μία καλλιέργεια των 5mL που έχει αναπτυχθεί για 16h, και επωάζονται στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) ώσπου η οπτική απορρόφηση της οπτικής πυκνότητας ήταν $OD_{600nm}=0.6-0.7$ όπου και θεωρείται ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ακολουθεί επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με προσθήκη IPTG. Η καλλιέργεια διαιρείται σε σωλήνες τύπου falcon χωρητικότητας 50mL (x10mL καλλιέργειας) οι οποίοι ονομάζονται ανάλογα με τη συγκέντρωση του επαγωγέα: "control", "0.1", "0.5" ή και "1". Στο σωλήνα "control" δεν προστίθεται επαγωγέας, στο σωλήνα "0.1" προστίθεται επαγωγέας σε τελική συγκέντρωση 0.1mM, στο σωλήνα "0.5" προστίθεται επαγωγέας (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0.5mM και στο σωλήνα "1"

προσθήεται επαγωγέας (*IPTG*) σε τελική συγκέντρωση 1mM. Οι καλλιέργειες μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης αφήνονται να αναπτυχθούν για ακόμη 4h στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm). Μετά το πέρας της επώασης, η καλλιέργεια τοποθετείται σε πάγο και το σύνολο της καλλιέργειας (10mL) και φυγοκεντρήται στα 11000xg για 5min στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κυτταρικά ιζήματα φυλάσσονται στους -20 °C. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία για όλες τις κυτταρικές σειρές. Να σημειωθεί πως όλοι οι χειρισμοί βακτηρίων και αποστειρωμένων θρεπτικών μέσων, γίνονται υπό στείρες συνθήκες μέχρι και το στάδιο της φυγοκέντρωσης.

- Επαγωγή υπερέκφρασης στους 25°C: Ακολουθείται η ίδια πειραματική πορεία όπως και με τους 37°C με τη μόνη διαφορά ότι μετά την επαγωγή ο χρόνος επώασης στους 25°C ανέρχεται στις 16h καθώς η θερμοκρασία δεν είναι ιδανική για την ανάπτυξη των βακτηρίων και συνεπώς η διαδικασία χρειάζεται περισσότερο χρόνο.
- Επαγωγή υπερέκφρασης στους 18°C: Ακολουθείται η ίδια πειραματική πορεία όπως και με τους 37°C με τη μόνη διαφορά ότι μετά την επαγωγή ο χρόνος επώασης στους 18°C ανέρχεται στις 16h καθώς η θερμοκρασία δεν είναι ιδανική για την ανάπτυξη των βακτηρίων και συνεπώς η διαδικασία χρειάζεται περισσότερο χρόνο. Στην συγκεκριμένη θερμοκρασία και σε κύτταρα B834rlyS δοκιμάστηκαν και επιπλέον συγκεντρώσεις επαγωγέα. Σε υγρές καλλιέργειες αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth (x20 ml) πραγματοποιήθηκε επαγωγή με 0.08mM *IPTG*, 0.16mM *IPTG*, 0.5mM *IPTG* και 1mM *IPTG*.
- Επαγωγή υπερέκφρασης σε σχέση με την ώρα: 60ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth (χειροποίητο) στο οποίο έχει προστεθεί καναμυκίνη (20μg/ml), πυριδοξίνη (100μg/ml) και MnCl₂ (4.8mM) εμβολιάζεται με 1/100 από μία καλλιέργεια των 5mL ,κυτταρικής σειράς B834, που έχει αναπτυχθεί για 16h, και επωάζονται στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) ώσπου η οπτική απορρόφηση της οπτικής πυκνότητας ήταν OD_{600nm}=0.6-0.7 Abs. Ακολουθεί επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με προσθήκη *IPTG*. Η καλλιέργεια διαιρείται σε σωλήνες τύπου falcon χωρητικότητας 50mL (x10mL καλλιέργειας) οι οποίοι ονομάζονται ανάλογα με τη συγκέντρωση του επαγωγέα και με την ώρα που θα διαρκέσει η επαγωγή σε : "control", "1h", "2h", "3h" και "4h". Στο σωλήνα "control" δεν προσθήεται επαγωγέας, ενώ στους υπόλοιπους σωλήνες προσθήεται επαγωγέας σε τελική συγκέντρωση 0.1mM. Οι καλλιέργειες αφήνονται να αναπτυχθούν στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) και ανά

κάθε μία ώρα που περνάει ο αντίστοιχος σωλήνας τοποθετείται σε πάγο και το σύνολο της καλλιέργειας (10mL) φυγοκεντρείται στα 11000xg για 5min στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κυτταρικά ιζήματα φυλάσσονται στους -20 °C.

3.2.4.2. Λύση κυττάρων

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε μετά την υπερέκφραση, αποψύχθηκε ελαφρώς σε πάγο ώστε να είναι εύκολο στη μεταχείριση. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και στη συνέχεια το διάλυμα υποβλήθηκε σε μηχανική λύση με υπερήχους. Η πλήρης λύση των κυττάρων έγινε σε 1 κύκλο των 5-15 sec, όπου η συσκευή υπερήχων επί 5-15 sec παράγει υπερήχους εύρους 70%, σε συνεχόμενους κύκλους, οι οποίοι διαπερνούν το κυτταρόλυμμα. Κατά τη διάρκεια της λύσης με υπερήχους αυξάνεται κατά πολύ η θερμοκρασία του διαλύματος, για το λόγο αυτό ο σωλήνας, στον οποίο εμπεριέχεται το διάλυμα προς λύση, βρίσκεται σε πάγο ώστε να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη αυτή αύξηση της θερμοκρασίας. Στο στάδιο αυτό, φυλάχθηκε δείγμα (~50μL) του ολικού εκχυλίσματος, καθώς στο διάλυμα των λυμένων κυττάρων περιέχονται και διαλυτά και αδιάλυτα στοιχεία, το οποίο θα ελεγχθεί με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Στη συνέχεια, το υπόλοιπο διάλυμα των λυμένων κυττάρων υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση στις 13000rpm/4°C για 30 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση, διαχωρίστηκε το υπερκείμενο από το ίζημα, καθώς αποτελείτο από τα κυτταρικά υπολείμματα και το υπερκείμενο φυλάχθηκε στους -20 °C, έως ότου έγινε ανάλυση με SDS-PAGE.

3.2.4.3. Μεσαίας κλίμακας απομόνωση της ανασυνδυασμένης His-hIGPb με σφαιρίδια Ni-NTA Agarose

Η πρόσδεση της πρωτεΐνης βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ της ετικέτας των 6 Ιστιδινών της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και των ακινητοποιημένων ιόντων Ni^{2+} . Ο προσδέτης αποτελείται από χηλικό νιτρίλοτριοξικό οξύ (NTA) ακινητοποιημένο σε δίκτυο συνδεδεμένη (*cross-linked*) αγαρόζη, η οποία είναι χημικά και φυσικά πιο ανθεκτική από την απλή αγαρόζη. Επιπρόσθετα επιδεικνύει καλύτερα χαρακτηριστικά ροής και ανθεκτικότητας σε οργανικούς διαλύτες. Ο NTA είναι μία χηλική τετραδοντική ένωση που καταλαμβάνει τέσσερις από τις έξι θέσεις πρόσδεσης στη σφαίρα του ιόντος Ni^{2+} . Οι υπόλοιπες δύο θέσεις καταλαμβάνονται συχνά από μόρια νερού τα οποία μπορούν εύκολα

να αντικατασταθούν από τα υπολείμματα ιστιδίνης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Αυτή η διαμόρφωση στις θέσεις πρόσδεσης το καθιστά κατάλληλο για την απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με ετικέτα 6 ιστιδινών. Οι δύο διαθέσιμες θέσεις πρόσδεσης επιτρέπουν την ισχυρή μεν αλλά αντιστρεπτή δε πρόσδεση της πρωτεΐνης επιτρέποντας έτσι και άλλες αλληλεπιδράσεις. Χάρη στη διαμόρφωση τα ιόντα Ni^{2+} δεν εκπλένονται κατά τη διάρκεια του καθαρισμού και η σύνδεση είναι ειδική[68].

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαθέσιμο από τη *Macherey-Nagel* και η μεσαίας κλίμακας απομόνωση της His-hIGPb έγινε ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή με ορισμένες τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, αφού το υλικό (που περιέχει τα σφαιρίδια) εξισορροπήθηκε με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης B (μεσαίας κλίμακας καθαρισμός), προστέθηκε το κυτταρόλυμα και επώαστηκαν για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό διαρκή περιστροφή. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθίζηση των σφαιριδίων με φυγοκέντρηση στα 400×g για 5 min, το υπερκείμενο της οποίας φυλάχθηκε ως το υπερδιήθημα. Κατόπιν, προστέθηκαν 10cn ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης στήλης A (μεσαίας κλίμακας καθαρισμός), και αφού αναδεύτηκε, υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση στα 400×g για 5 min, το υπερκείμενο της οποίας φυλάχθηκε ως το κλάσμα έκπλυσης. Το βήμα έκπλυσης των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια επαναλήφθηκε δυο επιπλέον φορές. Τέλος, η έκλυση της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια έγινε με προσθήκη 1cn ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-5 λεπτά υπό διαρκή περιστροφή και φυγοκέντρηση στις 400×g για 5 min. Το βήμα έκλυσης των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια επαναλήφθηκε δυο επιπλέον φορές.

Εναλλακτικά, το κυτταρόλυμα επώαστηκε για 1h στους 4°C υπό συνεχή περιστροφή. Κατόπιν υπέστη φυγοκέντρηση στις 400×g για 5 min και το ίζημα, αποτελούμενο από τα σφαιρίδια και την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη (*His-hIGPb*), αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*SDS-PAGE*).

3.2.5. Αναλυτικές μέθοδοι

3.2.5.1. Ηλεκτοφόρηση DNA

Η ηλεκτροφόρηση συγκεκριμένων τμημάτων DNA σε πηκτές αγαρόζης και η απομόνωση τους από αυτές αποτελεί έναν απλό και αποδοτικό τρόπο διαχωρισμού και καθαρισμού τους. Η μέθοδος βασίζεται στην παρασκευή πηκτών με προσθήκη αγαρόζης σε κατάλληλο

ρυθμιστικό διάλυμα και θέρμανση έως ότου σχηματιστεί ένα διαυγές διάλυμα. Με την ψύξη του διαλύματος σχηματίζεται ένα πλέγμα του οποίου η πυκνότητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα του *DNA*, που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, μετακινούνται προς την άνοδο. Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων *DNA* εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων του *DNA*, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη διαμόρφωση των τμημάτων *DNA*, το δυναμικό που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πηκτή με συγκέντρωση αγαρόζης 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE, παρουσία Midori Green. Το Midori Green παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του *DNA* και αποτελεί μια μη καρκινογόνο εναλλακτική του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτές αγαρόζης. Εκπέμπει πράσινο φθορισμό όταν είναι προσδεδεμένο σε *DNA* ή *RNA* (~530nm) όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία χαμηλού μήκους κύματος (~270nm)[69]. Το ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων που χρησιμοποιήθηκε είναι το TAE 1x, ενώ έγινε εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τάσης 90V και παρακολούθηση του μετώπου των χρωστικών που ενυπάρχουν στο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (6x loading buffer). Για την εξαγωγή των πλασμιδιακών φορέων χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin Plasmid set της εταιρίας Macherey-Nagel.

3.2.5.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ξεκινάει με την προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμίδιου. Καθώς, η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών έχει ως στόχο το διαχωρισμό τους βάσει του μοριακού τους βάρους, επιλέγεται κάθε φορά η πυκνότητα της πηκτής που θα χρησιμοποιηθεί ανάλογα με την πρωτεΐνη που επιλέγεται να ανιχνευθεί. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα ηλεκτροφόρησης είναι ασυνεχές, δηλαδή αποτελείται από 2 πηκτές διαφορετικής πυκνότητας. Η πηκτή επιστοιβάξης η οποία έχει σταθερή πυκνότητα 5%, και η πηκτή διαχωρισμού της οποίας η πυκνότητα είναι που κάθε φορά προσαρμόζεται ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Ο ρόλος της πηκτής επιστοιβάξης είναι να κινηθούν οι πρωτεΐνες (εξ ου και η πιο αραιή του σύσταση) και να στοιβαχτούν σε μια κοινή ζώνη ώστε να εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού και να δημιουργηθεί ένα ενιαίο μέτωπο κατά την ηλεκτροφόρηση της πηκτής. Καθώς σε ένα μίγμα πρωτεϊνών εμπεριέχονται πρωτεΐνες διαφόρων μοριακών βαρών, η κίνηση αυτών περιορίζεται από την πηκτή, που δρα ως ηθμός, καθώς το μέγεθος των πόρων του πλέγματος που

δημιουργούνται αυξάνει τις διαφορές στην κινητικότητα μεταξύ πρωτεϊνών που διαφέρουν σε μέγεθος. Ο σχηματισμός της πηκτής γίνεται με την αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου, σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία των παραγόντων υπερθειικό αμμώνιο (APS) και TEMED. Το TEMED είναι επιταχυντής, το οποίο καταλύει την αντίδραση πολυμερισμού των ελεύθερων ριζών του θείου που δημιουργούνται από το APS. Η κατασκευή όπου θα δημιουργηθεί η πηκτή του πολυακρυλαμιδίου είναι μια κάθετη διάταξη 2 τζαμιών τα οποία μεταξύ τους απέχουν 1mm. Οι θέσεις υποδοχής του δείγματος (ή πηγάδια) δημιουργούνται με την προσθήκη μιας χτένας που δημιουργεί τα πηγάδια κατά την πήξη της πηκτής επιστοιβάξης. Μόλις η πηκτή είναι έτοιμη τοποθετείται, μαζί με το ικρίωμά της, στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1× (Running Buffer 1×) το οποίο πρέπει να είναι σε επαφή με την πηκτή σε όλο της το μήκος και πλάτος. Τα δείγματα προετοιμάζονται με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4× έτσι ώστε σε όλα να περιέχεται ίση συγκέντρωση πρωτεΐνης και η τελική αραιώση των δειγμάτων να είναι 1×. Στη συνέχεια, τοποθετούνται για 5min στους 95-98°C ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών που περιέχονται σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί η φόρτωση των δειγμάτων στα πηγάδια, ενώ παράλληλα σε ένα από τα πηγάδια φορτώνεται ο μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. Τέλος, η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται στο τροφοδοτικό το οποίο διαβιβάζει ρεύμα τάσης 120V στο κλειστό κύκλωμα μεταξύ της δεξαμενής της συσκευής ηλεκτροφόρησης[70] .

Για την ηλεκτροφόρηση της hIGPb προτιμήθηκε πηκτή ακρυλαμιδίου 10% καθώς η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι μεγάλου μοριακού βάρους. Η σύσταση της πηκτής διαχωρισμού και της πηκτής επιστοιβάξης παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα.

Πηκτή διαχωρισμού 10%		Πηκτή επιστοιβάξης 5%	
dH ₂ O	1.9 ml	dH ₂ O	2.1 ml
Tris-HCl 1.5M pH8.8	1.3 ml	Tris-HCl 1.5M pH6.8	380 μl
SDS 10%	50 μl	SDS 10%	30 μl
Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	1.7 ml	Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	500 μl
APS 10%	50 μl	APS 10%	30 μl
TEMED	2 μl	TEMED	3 μl

3.2.5.3. Διάλυμα φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού

ο Μίγμα διαλύματος 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου, 100 mM οξικού ψευδαργύρου. Το pH του μίγματος ρυθμίστηκε στο 5.0 με πυκνό HCl και φυλάξαμε το διάλυμα σε αδιαφανές μπουκάλι και μακριά από ηλιακή ακτινοβολία σε θερμοκρασία δωματίου.

ο Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0. Η ρύθμιση του pH έγινε με πυκνό NaOH και φυλάξαμε το διάλυμα σε αδιαφανές μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα ασκορβικού οξέος παρασκευάζεται φρέσκο κάθε φορά.

Τα δύο διαλύματα αναμιγνύονται σε αναλογία 4:1 σε ένα αδιαφανές σκούρο δοχείο. Το μίγμα αφήνεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου ώσπου να σχηματιστεί μία έγχρωμη ένωση. Κατάλληλη ποσότητα διαλύματος προσθέτεται στα δείγματα που πρόκειται να φωτομετρηθούν και επωάζονται σε θερμοκρασία 30°C για άλλα 15 min σε υδατόλουτρο.

3.2.5.4. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών-Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford είναι μια χρωματική μέθοδος που βασίζεται στο εύρος των απορροφήσεων της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Υπό όξινες συνθήκες, η εν λόγω χρωστική αντιδρά με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί την μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής Coomassie, με το σύμπλοκο που δημιουργείται να εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm. Τυχόν αύξηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm είναι ενδεικτική της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη. Αρχικά, παρασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας μια σειρά προτύπων διαλυμάτων πρωτεΐνης BSA γνωστής συγκεντρώσεως. Σε όγκο 20 μl από το εκάστοτε πρότυπο δείγμα προστέθηκαν 780 μl απιονισμένο ύδωρ και 200 μl αντιδραστηρίου Bradford 5x, έτσι ώστε να γίνει 1x. Τα διαλύματα (όγκου 1 mL) αναδεύτηκαν και αφέθηκαν προς επώαση σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 10 min. Έπειτα έγινε ανάδευση των διαλυμάτων και ακολούθησε η φασματοφωτομέτρησή τους σε μήκος κύματος 595 nm και υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με βάση την πρότυπη καμπύλη

3.2.6. Υπερέκφραση της *hIGPb* από τα κύτταρα *BL21-Gold (DE3)*

Σε τέσσερις φλάσκες, χωρητικότητας 2L, η κάθε μία, τοποθετήθηκε υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth (χειροποίητο), όγκου $\leq 1/3$ της χωρητικότητας της φλάσκας. Οι αποστειρωμένες φλάσκες διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση τους. Υπό στείρες συνθήκες, προστέθηκε στις φλάσκες από 100μg/mL του αντιβιοτικού αμικικιλίνη, 100 μg/ml πυριδοξίνης και 4.8 mM $MnCl_2$. Έγινε λήψη 1mL του θρεπτικού μέσου μετά την προσθήκη των παραπάνω ουσιών, το οποίο αποτέλεσε το μάρτυρα κατά τη φασματοφωτομετρική παρακολούθηση της πορείας της καλλιέργειας. Στη συνέχεια, οι φλάσκες εμβολιάστηκαν με όγκο 1/100 από μια υγρή καλλιέργεια των BL21-Gold και επωάστηκαν στους 37°C υπό ανάδευση (180-210rpm) ώπου η οπτική απορρόφηση της οπτικής πυκνότητας ήταν $OD_{600nm}=0.7$ όπου και θεωρείται ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ακολούθησε επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με την προσθήκη *IPTG* σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM. Η επαγωγή της υπερέκφρασης διήρκεσε 16h στους 18 °C υπό ανάδευση (180-210 rpm). Όσο είναι παρόν το *IPTG* στη βακτηριακή καλλιέργεια, θα παράγεται το *RNA* της προς μελέτη πρωτεΐνης. Μετά το πέρας της επαγωγής η καλλιέργεια των βακτηρίων φυγοκεντρήθηκε σε δοχεία συλλογής στις 5000rpm/4°C για 30min. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε καθώς αποτελεί το θρεπτικό μέσο και το κυτταρικό ίζημα φυλάχθηκε στους -20°C.

3.2.7. Λύση βακτηριακών κυττάρων

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε μετά την υπερέκφραση, αποψύχθηκε ελαφρώς σε πάγο ώστε να είναι εύκολο στη μεταχείριση. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα εξισσορόπησης στήλης A (χρωματογραφία συγγένειας 1) και στη συνέχεια το διάλυμα υποβλήθηκε σε μηχανική λύση με υπερήχους. Η πλήρης λύση των κυττάρων έγινε σε 3 κύκλους των 15 sec, όπου η συσκευή υπερήχων επί 15 sec παράγει υπερήχους εύρους 70%, σε συνεχόμενους κύκλους, οι οποίοι διαπερνούν το κυτταρόλυμα και για 30 sec σταματάει την παραγωγή υπερήχων. Κατά τη διάρκεια της λύσης με υπερήχους αυξάνεται κατά πολύ η θερμοκρασία του διαλύματος, για το λόγο αυτό, η λύση γίνεται με παύσεις και ενώ ο σωλήνας, στον οποίο εμπεριέχεται το διάλυμα προς λύση, βρίσκεται σε πάγο ώστε να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη αυτή αύξηση της θερμοκρασίας. Στη συνέχεια, το διάλυμα των λυμένων κυττάρων υποβλήθηκε σε φυγοκέντρωση στις 13000rpm/4°C για 45 λεπτά.

3.2.8. Υγρή χρωματογραφία αγκιστείας (σύστημα FPLC)

Το σύστημα FPLC είναι ένας τύπος υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών από ένα μίγμα. Η βασική αρχή της δεν διαφέρει από αυτή της απλής υγρής χρωματογραφίας συγγένειας, με τη διαφορά ότι το σύστημα είναι πιο αυτοματοποιημένο και τα διαλύματα περνούν μέσα από το σύστημα χρησιμοποιώντας αντλίες θετικής μετατόπισης, οι οποίες μεταφέρουν υγρό μέσα στο σύστημα υπό υψηλή πίεση. Μετά τη λύση και τη φυγοκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων, το υπερκείμενο πέρασε από φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45μm και στη συνέχεια το διάλυμα των πρωτεϊνών εναποτέθηκε στο σωλήνα *superloop*. Για την απομόνωση τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι τα διαλύματα εξισορρόπησης-έκπλυσης και έκλουσης, τα οποία πριν χρησιμοποιηθούν φιλτραρίστηκαν υπό κενό με φίλτρο 0.45μm και απαερώθηκαν με χρήση υπερήχων. Τα διαλύματα εξισορρόπησης-έκπλυσης και έκλουσης τοποθετούνται στις αντίστοιχες αντλίες του μηχανήματος ÄKTApurifier (GE Healthcare). Η πορεία της χρωματογραφίας ελέγχεται από το υπολογιστικό πρόγραμμα Unicorn™.

3.2.9. Απομόνωση της *hIGPb* με στήλη αγκιστείας Ni^{2+} σεφαρόζης

Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι η HisTrapHP και ήταν διαθέσιμη από την εταιρία GE Healthcare, και είναι μια στήλη όγκου 1mL Ni^{+2} σεφαρόζης, η οποία εξισορροπείται με 15-20 όγκους στήλης (cv) από το αντίστοιχο διάλυμα. Στη συνέχεια, ρυθμίζοντας την πίεση και το ρυθμό ροής, η πρωτεΐνη πέρασε μέσα από τη στήλη, ώστε ό,τι είναι ειδικό προς αυτή να προσδεθεί στα σφαιρίδια αγαρόζης, που φέρουν ακινητοποιημένο Ni^{+2} , και ότι δεν είναι ειδικό να εκπλυθεί στα κλάσματα υπερδιηθήματος (*flow-through*). Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή πως τα ιόντα Ni^{+2} έχουν συγγένεια με την σηματοδοτική ετικέτα ιστιδινών που φέρει η πρωτεΐνη που έχει υπερεκφραστεί. Κατά την έκπλυση της στήλης, ό,τι δεν έχει αγκιστεία για τα σφαιρίδια αγαρόζης, που φέρουν το νικέλιο, θα εκπλυθεί και θα συλλεχθεί σε κλάσματα. Ακολουθώντας, συνεχίζει η έκλυση της πρωτεΐνης, η οποία γίνεται με βαθμίδωση συγκέντρωσης (0-100%) του διαλύματος έκλουσης. Μόλις το διάλυμα έκλουσης έχει φτάσει στο 100% της συγκέντρωσής του, η στήλη εξισορροπείται εκ νέου με διάλυμα εξισορρόπησης-έκπλυσης και στη συνέχεια αποθηκεύεται σε 20% αιθανόλη. Εναλλακτικά η έκλυση της στήλης μπορεί να γίνει και σε συγκεκριμένα βήματα συγκέντρωσης (step gradient 15%, 50% και 100%).

Η μέθοδος ονομάζεται χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) και βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιόντων στοιχείων μετάπτωσης (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} ,

Zn²⁺) τα οποία είναι ακινητοποιημένα πάνω σε ρητίνη και κάποιων συγκεκριμένων πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων[71]. Η ιστιδίνη είναι το αμινοξύ που επιδεικνύει την ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τις ρητίνες που φέρουν ακινητοποιημένα ιόντα[71],[72], με τις ομάδες δοτών ηλεκτρονίων στον ιμιδαζολικό δακτύλιο της ιστιδίνης να σχηματίζει ημιπολικούς δεσμούς με το ακινητοποιημένο ιόν μετάλλου μετάπτωσης[71].

3.2.10. Αφαίρεση σηματοδοτικής ετικέτας από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *His-hlGPb*

Οι ετικέτες αγχιστείας (*affinity tags*) είναι απαραίτητα εργαλεία για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς όχι μόνο διευκολύνουν την ταυτοποίηση και την απομόνωση των πρωτεϊνών με τις οποίες είναι συντηγμένες αλλά επίσης μπορεί να έχουν ωφέλιμη επίδραση στις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες και να οδηγήσουν στην αύξηση της διαλυτότητας και να προωθήσουν τη σωστή τους αναδίπλωση[73].

Όλες οι ετικέτες αγχιστείας, είτε μεγάλες είτε μικρές, είναι πιθανό να επέμβουν στη βιολογική δράση της πρωτεΐνης, να παρεμποδίσουν την κρυστάλλωσή της ή να επηρεάσουν τη συμπεριφορά της με άλλο τρόπο[74]. Συνεπώς, είναι συνήθως επιθυμητό, και συνετό, να αφαιρεθεί η ετικέτα αγχιστείας[73],[74]. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται ένζυμα, είτε ενδοπρωτεάσες είτε εξωπρωτεάσες[74]. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η πρωτεάση TEV. Η TEV είναι η καταλυτική περιοχή 27 kDa, της πρωτεΐνης *Nuclear Inclusion a* (Nla), που εκφράζεται από τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*tobacco etch virus*). Η αλληλουχία της παρουσιάζει μεγάλη εξειδίκευση καθιστώντας την TEV ιδανικό ένζυμο για τον καθαρισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τις ετικέτες αγχιστείας τους. Αναγνωρίζει ένα γραμμικό επίτοπο της γενικής μορφής E-Xaa-Xaa-Y-Xaa-Q- (G / S) και το «κόψιμο» γίνεται μεταξύ Q και G ή Q και S. Η πιο συχνά αναγνωρίσιμη ακολουθία είναι η ENLYFQG. Η δομή της είναι παρόμοια με αυτή των πρωτεασών σερίνης όπως η χυμοθρυψίνη[75], και χρησιμοποιεί μία καταλυτική τριάδα υπολειμμάτων που προωθούν την υδρόλυση του πεπτιδίου.

3.2.11. Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

Η μέθοδος στηρίζεται στο διαχωρισμό των μορίων με βάση το φορτίο τους. Οι ιδιότητες των μορίων ποικίλουν σημαντικά όσον αφορά το φορτίο τους και για το λόγο αυτό εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης όταν έρχονται σε επαφή με φορτισμένο

χρωματογραφικό μέσο. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές βασίζονται στις διαφορές στο συνολικό φορτίο των μορίων, στην πυκνότητα του φορτίου τους και τέλος στην κατανομή του επιφανειακού τους φορτίου. Οι φορτισμένες ομάδες που βρίσκονται εντός κάποιου μορίου και συμβάλλουν στο επιφανειακό φορτίο, κατέχουν διαφορετικές σταθερές ιοντικής ισχύς (pK_a) που εξαρτώνται από τη δομή και από το περιβάλλον τους. Δεδομένου ότι όλα τα μόρια με ιονιζόμενες ομάδες μπορούν να τιτλοδοτηθούν, το επιφανειακό τους φορτίο εξαρτάται απόλυτα από το pH του περιβάλλοντος. Έτσι και στην περίπτωση των πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούνται από πολλά διαφορετικά αμινοξέα που περιέχουν ασθενής όξινες και βασικές ομάδες (αμφοτερικές ενώσεις), το επιφανειακό τους φορτίο αλλάζει σταδιακά ανάλογα με την αλλαγή στο περιβάλλον.

Η χρωματογραφία ιονανταλλαγής εκμεταλεύεται τη χαρακτηριστική σχέση μεταξύ του επιφανειακού φορτίου και του pH, που είναι μοναδική για κάθε πρωτεΐνη. Κατά το διαχωρισμό, αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτισμένων μορίων και των αντίθετα φορτισμένων χρωματογραφικών μέσων ευνοούν την πρόσδεση ή την έκλουση ειδικών μορίων, προωθώντας με αυτό τον τρόπο τον σωστό διαχωρισμό τους. Όταν μία πρωτεΐνη είναι φορτισμένη σε τιμή κοντά στο ισοηλεκτρικό της σημείο (pI) τότε δεν θα πραγματοποιηθεί καμία αλληλεπίδραση με το χρωματογραφικό μέσο. Ωστόσο σε pH μεγαλύτερου του pI της, θα προσδένεται σε ένα θετικό μέσο χρωματογραφίας ή αλλιώς ανιονανταλλακτικό. Όταν θα βρίσκεται σε pH μικρότερου του pI της θα προσδένεται σε αρνητικά φορτισμένο χρωματογραφικό μέσο ή αλλιώς κατιονανταλλακτικό[76].

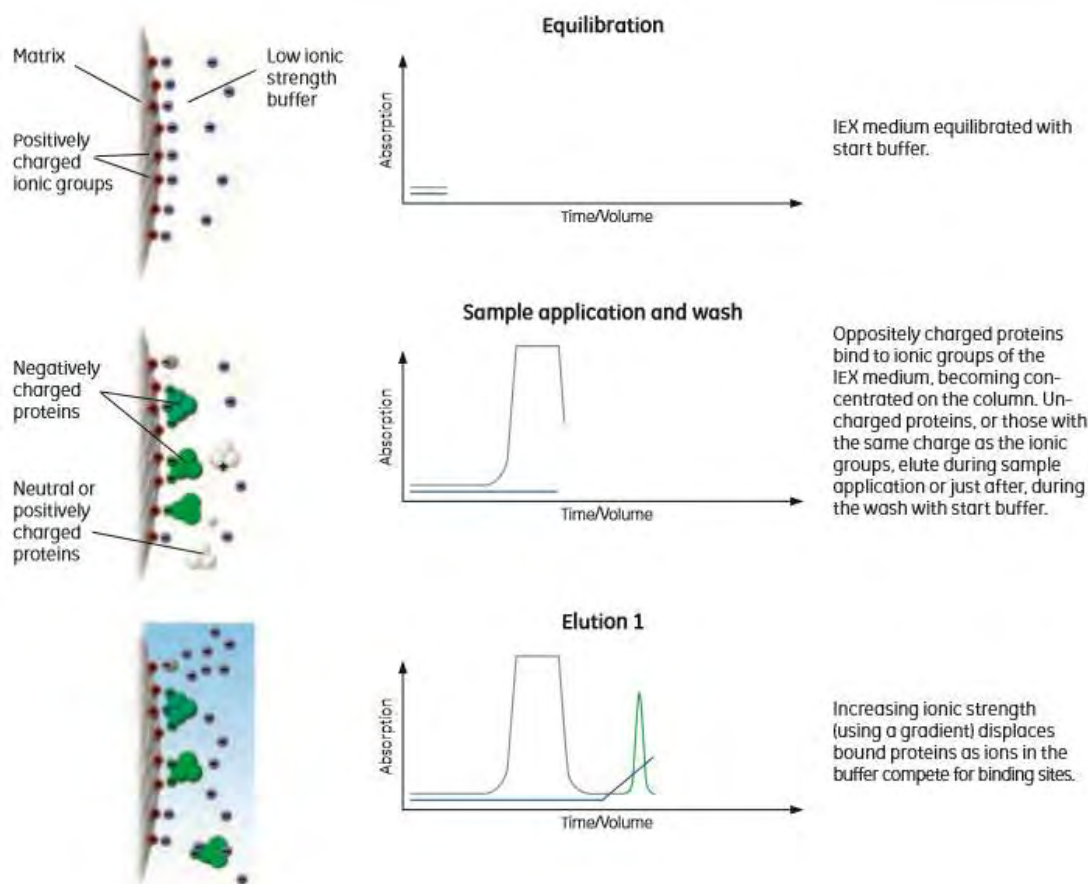
Στη συγκεκριμένη χρωματογραφία ιονανταλλαγής χρησιμοποιήθηκε ως μέσο η στήλη Resource Q, που αποτελεί μία ανιονανταλλακτική στήλη και ήταν διαθέσιμη από την εταιρία GE Healthcare. Το εύρος pH που επιτρέπει η χρήση της συγκεκριμένης στήλης είναι 2-12 και το όριο δέσμευσης 45 mg (BSA). Αποτελείται από μήτρα άκαμπτων σφαιρικών σωματιδίων με ελεγχόμενο μέγεθος διανεμημένων πόρων. Τα σφαιρικά σωματίδια είναι υποκατεστημένα με ιοντικές ομάδες που είναι θετικά φορτισμένες. Η μήτρα είναι πορώδης για να παρέχει μεγάλη εσωτερική επιφάνεια επαφής.

Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

- ο Εξισορρόπηση στήλης: Γίνεται εξισορρόπηση της στατικής φάσης στις επιθυμητές συνθήκες με ρυθμιστικό διάλυμα A (ρυθμιστικό διάλυμα A χρωματογραφίας ιονανταλλαγής 1, 2 ή 3). Όταν επιτευχθεί η εξισορρόπηση, τότε όλες οι φορτισμένες ομάδες της στατικής φάσης είναι συνδεδεμένες αντιστρεπτά με ιόντα αντίθετου φορτίου, όπως χλωρίου (Cl^-) ή νατρίου (Na^+). Το pH και η ιοντική ισχύς του αρχικού

διαλύματος επιλέγεται έτσι ώστε όταν γίνει η εισαγωγή του δείγματος να συνδεθεί στη στήλη μόνο η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει και να απομακρυνθούν όσο το δυνατόν οι ανεπιθύμητες.

- Εισαγωγή του δείγματος και πλύση: Το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη που θα εισάγουμε θα πρέπει να έχει το ίδιο pH και την ίδια ιοντική ισχύ με το διάλυμα που έχει εξισορροπηθεί η στήλη ώστε να προσδεθούν όλες οι κατάλληλα φορτισμένες πρωτεΐνες-στόχοι, και να απομακρυνθούν, με πλύση της στήλης, όλες οι προσμίξεις που δεν προσδέονται στη στήλη. Η πλύση της στήλης γίνεται συνήθως με το ρυθμιστικό διάλυμα A (ρυθμιστικό διάλυμα A χρωματογραφίας ιονανταλλαγής 1,2 ή 3) .
- Έκλουση: Αφού γίνει η εισαγωγή του δείγματος και η πλύση της στήλης, τότε ακολουθεί η έκλουση των προσδεδμένων πρωτεϊνών συνήθως με αύξηση της ιοντικής ισχύος (αύξηση στη συγκέντρωση άλατος) ή με αλλαγή του pH του διαλύματος έκλουσης. Η αύξηση της ιοντικής ισχύος πραγματοποιείται με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος B (ρυθμιστικό διάλυμα χρωματογραφίας ιονανταλλαγής 1,2 ή 3) το οποίο έχει μεγάλη συγκέντρωση NaCl. Με την σταδιακή αύξηση της ιοντικής ισχύος (διαβάθμιση συγκέντρωσης) τα ιόντα των αλάτων (συνήθως Na^+ ή Cl^-) ανταγωνίζονται τους προσδεδμένους παράγοντες στις φορτισμένες ομάδες της επιφάνειας του χρωματογραφικού υλικού της στήλης και σιγά σιγά οι προσδεδμένοι παράγοντες αρχίζουν να αποσυνδέονται και να εκλύονται από τη στήλη, καθώς η ιοντική ισχύς συνεχίζει να αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες με χαμηλότερο καθαρό φορτίο στο συγκεκριμένο pH, αρχίζουν να εκλύονται πρώτες ενώ οι πρωτεΐνες με το υψηλότερο καθαρό φορτίο είναι αυτές που συνδέονται πιο ισχυρά με τα φορτία της στήλης με αποτέλεσμα να εκλύονται τελευταίες. Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο θα γίνει η διαβάθμιση της συγκέντρωσης του παράγοντα έκλουσης, οι πρωτεΐνες εκλύονται σε διαφορετικό στάδιο σε πιο καθαρή και συμπυκνωμένη μορφή.
- Αναγέννηση: Για να απομακρυνθεί ότι έχει μείνει ισχυρά προσδεδμένο στη στήλη και να αναγεννηθεί πρέπει να γίνει έκπλυση της στήλης με ένα διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος. Αυτό οδηγεί σε πλήρη ανάκτηση της δεσμευτικής ικανότητας της στήλης ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά.



Εικόνα 9: Αρχή μεθόδου μίας ανιονανταλλακτικής στήλης[76].

3.2.12. Κινητικές μελέτες

Στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκε η έκφραση της *hIGPb* δηλαδή της ανενεργής μορφής του ενζύμου. Για να μελετηθεί η δραστηριότητα του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν μελέτες παρουσία κινάσης, η φωσφορυλίωση της *GP* γίνεται από τη γ-καταλυτική υπομονάδα της κινάσης (*PhK*). Σκοπός της μεθόδου είναι να μετρηθεί φωτομετρικά, με τη μέθοδο του ασκορβικού οξέος, η απελευθέρωση των ορθοφωσφορικών από την *G1P* κατά την ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο γλυκογόνο. Κατά την πορεία της αντίδρασης παράγεται γλυκογόνο με ένα κατάλοιπο γλυκόζης παραπάνω[77],[78].

Για την προετοιμασία του ενζυμικού μας διαλύματος, επώαστηκαν μαζί για 90min στους 30°C η φωσφορυλάση και η κινάση. Μετά την επώαση, η αντίδραση σταμάτησε με TEA buffer stop και αφέθηκε σε ηρεμία για 10min. Κατόπιν προστέθηκε γλυκογόνο 10%, επώαση για 15 min στους 30°C. Για κάθε υπόστρωμα προστέθηκαν 90μl του ενζυμικού διαλύματος.

Τα υποστρώματα βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 2mM, 4mM, 6mM, 10mM και 20mM (πριν την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος τα υποστρώματα έχουν επωαστεί στους 30°C για 3min ώστε να έχουν την σωστή θερμοκρασία). Οι διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος που μελετήσαμε βρίσκονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 2 το οποίο περιέχει 270 mM KCl, 135 mM ιμιδαζόλιο, 2.7 mM DTT, 2.7 mM EDTA και το παρασκευάσαμε με αραιώση από το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 1 που περιέχει 400 mM KCl, 200 mM ιμιδαζόλιο, 4 mM DTT, 4 mM EDTA. Αρχικά παρασκευάστηκε μήτρα πυκνού διαλύματος υποστρώματος 90mM, και ακολούθως παρασκευάστηκαν επόμενες μήτρες διαλύματος 9mM, 18mM, 27mM και 45mM, ώστε κάθε φορά παίρνοντας την ανάλογη ποσότητα και συμπληρώνοντας με dH₂O να έχουμε τις τελικές συγκεντρώσεις υποστρώματος που θέλουμε να μελετήσουμε, δηλαδή 2mM, 4mM, 6mM, 10mM και 20mM (σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα). Τελικός όγκος αντίδρασης τα 450μl (100μl G1P, 260μl dH₂O και 90μl ενζυμικού διαλύματος).

	Ρυθ. δ/μα αραιώσης 2 pH 6.8 (μl)	G1P mM (μl)	[G1P] mM στον τελικό όγκο της αντίδρασης
Μήτρα [G1P] mM			
9	990	10	2
18	800	200	4
27	700	300	6
45	500	500	10
90	675	225	20

Οι χρόνοι αντίδρασης που μετρήθηκαν ήταν 4min, 8min, 12min και 16min. Στους αντίστοιχους χρόνους, μέρος του δείγματος αφαιρούταν και τοποθετούταν σε σωλήνες τύπου *eppendorf* που περιείχαν 1% SDS προς παύση της ενζυμικής αντίδρασης. Στο τέλος προστέθηκε διάλυμα Ασκορβικού-Μολυβδενικού (pH 5) (βλ. 3.1.8.13) σε κάθε δείγμα, επωάστηκαν στους 30°C για 15min και φωτομετρήθηκαν στα 850nm.

3.2.13. Βελτιστοποίηση γονιδίου

Πολλές φορές, και ενώ έχουν προηγηθεί όλες οι απαραίτητες δοκιμές και αλλαγές στα πρωτόκολλα έκφρασης μιας πρωτεΐνης στόχου, τα επίπεδα της έκφρασης συνεχίζουν να είναι χαμηλά. Με τη χρήση ειδικών αλγορίθμων μελετάται το περιεχόμενο των κωδικονίων του επιθυμητού γονιδίου και προτείνεται βελτιστοποίηση. Οι αλγόριθμοι αυτοί εξετάζουν και βελτιστοποιούν μία ποικιλία παραμέτρων, σημαντικών για την απόδοση της έκφρασης. Μερικές από τις παράμετρους που εξετάζουν είναι: η συχνότητα εμφάνισης σπάνιων κωδικονίων, το περιεχόμενο του γονιδίου σε GC, η ύπαρξη περιοχών CpG (όταν κυτοσίνη ακολουθείται από γουανίνη), η 2ταγή δομή του *mRNA*, η ύπαρξη περιοχών εναλλακτικού ματίσματος, πρόωρες πολύ-A ουρές, μοτίβα αστάθειας του *RNA*, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και θέσεις που δρουν περιοριστικά ένζυμα και θα μπορούσαν να επηρεάσουν την κλωνοποίηση. Επιπλέον σκοπεύουν στην αύξηση της απόδοσης της έναρξης και του τερματισμού της μετάφρασης[79]. Οι αλγόριθμοι αυτοί εφ' όσον εξετάσουν όλους αυτούς τους παράγοντες, καταλήγουν να βελτιστοποιούν όσο το δυνατό περισσότερους από αυτούς, δίνοντας τελικά το μοναδικό γονίδιο με τη μέγιστη δυνατή απόδοση σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης. Η βελτιστοποίηση συμβαίνει με σιωπηλές μεταλλάξεις. Κατά αυτόν τον τρόπο το γονίδιο γίνεται πιο εύκολο να μεταφραστεί από τον οργανισμό ξενιστή ενώ παράλληλα διατηρεί την 2ταγή δομή του. Η διαδικασία είναι εμπορικά διαθέσιμη από διάφορες εταιρίες σύνθεσης γονιδίων.

Αποτελέσματα

4. Αποτελέσματα

4.1. Ανάπτυξη κυττάρων

Με σκοπό να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης των βακτηρίων πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε ότι αφορά την συγκέντρωση των διάφορων συμπαράγοντων που λαμβάνουν μέρος στην έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Παρουσιάστηκαν προβλήματα στην ανάπτυξη μικρής κλίμακας [10ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου, 37°C, 16 h και υπό συνεχή ανάδευση 210rpm] με το επιθυμητό πλασμίδιο και για το λόγο αυτό δοκιμάστηκαν η πυριδοξίνη σε συγκεντρώσεις 50μg/ml και 100μg/ml, όπως επίσης και το MnCl₂ σε συγκεντρώσεις 2.4mM και 4.8mM. Επίσης δοκιμάστηκε και η προσθήκη MgCl₂ αντί του MnCl₂ σε συγκεντρώσεις 5mM και 10mM.

Πιο συγκεκριμένα σε κύτταρα BL 21 Gold, B834 και B834plysS και σε θρεπτικό μέσο LB Broth (Applichem) δοκιμάστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις:

- 100μg/ml πυριδοξίνη, 4.8mM MnCl₂: οι υγρές καλλιέργειες δεν αναπτύχθηκαν.
- 50μg/ml πυριδοξίνη, 4.8mM MnCl₂: οι υγρές καλλιέργειες δεν αναπτύχθηκαν.
- 100μg/ml πυριδοξίνη, 2.4mM MnCl₂: οι υγρές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν.
- 50μg/ml πυριδοξίνη, 2.4mM MnCl₂: οι υγρές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν.
- 100μg/ml πυριδοξίνη, 4.8mM MnCl₂, 5mM MgCl₂ : οι υγρές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν.
- 100μg/ml πυριδοξίνη, 2.4mM MnCl₂, 5mM MgCl₂ : οι υγρές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν.
- 100μg/ml πυριδοξίνη, 5mM MgCl₂ : οι υγρές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν.

Οι ίδιες ακριβώς συνθήκες δοκιμάστηκαν και σε θρεπτικό μέσο 2YT καθώς επίσης και σε θρεπτικό μέσο LB Broth χειροποίητο και η ανάπτυξη των καλλιεργειών ήταν επιτυχής σε

όλες. Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε είναι ampicillin σε συγκέντρωση 50μg/ml και στα B834plysS προστέθηκε επιπλέον chloramphenicol σε τελική συγκέντρωση 34μg/ml καθώς η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας και σε αυτό το αντιβιοτικό. Οι συγκεκριμένες μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε πλασμίδιο pDEST-14 με το μη βελτιστοποιημένο γονίδιο.

Υπήρξαν προβλήματα στην ανάπτυξη των υγρών καλλιιεργειών όταν χρησιμοποιούταν LB Broth (Applichem) και υπήρχε προσθήκη $MnCl_2$ σε συγκέντρωση μεγαλύτερη ή ίση των 4.8mM. Δοκιμάζοντας και άλλα θρεπτικά μέσα το πρόβλημα λύθηκε.

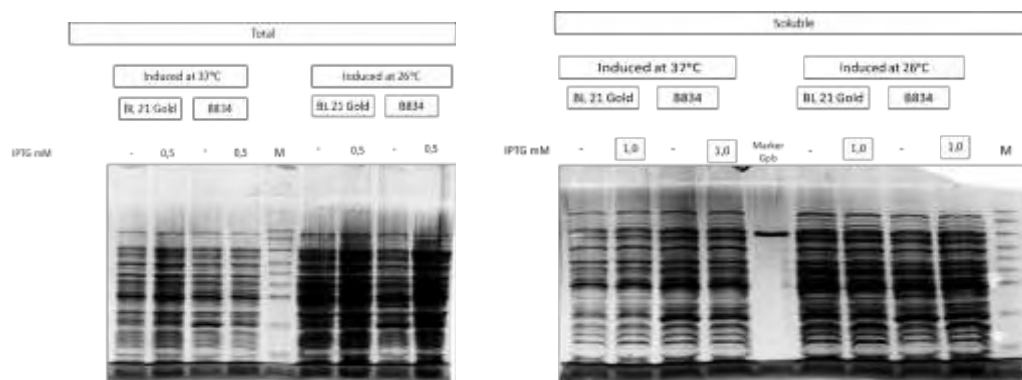
4.2. Μελέτες έκφρασης της His-hIGPb

4.2.1. Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (πλασμιδιακός φορέας pDEST-14)

4.2.1.1. Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (BL 21 Gold, B834/ 25°C, 37°C)

Με σκοπό την απομόνωση της hIGPb σε μεγάλη κλίμακα έγιναν μελέτες διαφόρων συνθηκών ανάπτυξης της βακτηριακής καλλιέργειας. Έγινε έλεγχος του προτύπου έκφρασης σε βακτήρια E.coli διαφόρων στελεχών σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω (βλ. 3.2.4.1). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη hIGPb αναμένεται να έχει μοριακή μάζα γύρω στα 98 KDa μαζί με τις 6 Ιστιδίνες της ετικέτας. Αρχικά έγινε έλεγχος στις κυτταρικές σειρές BL 21 Gold και B834. Καλλιέργειες των 10ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth (Applichem) [100μg/ml πυριδοξίνη και 2.4mM $MnCl_2$] επωάστηκαν μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν $OD_{600nm} = 0,7$ Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Δοκιμάστηκαν δύο θερμοκρασίες επώασης 25°C και 37°C και δύο συγκεντρώσεις επαγωγέα 0mM και 1mM (εικόνα 4.1). Για κάθε θερμοκρασία διατηρήθηκε συγκεκριμένη ώρα επώασης 4h για τους 37°C και 16h για τους 25°C. Τέλος, έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λυσης 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 200mM NaCl] και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10%, έως ότου το μέτωπο των χρωστικών ηλεκτροφόρησης να πλησιάσει το τέλος της πηκτής. Η

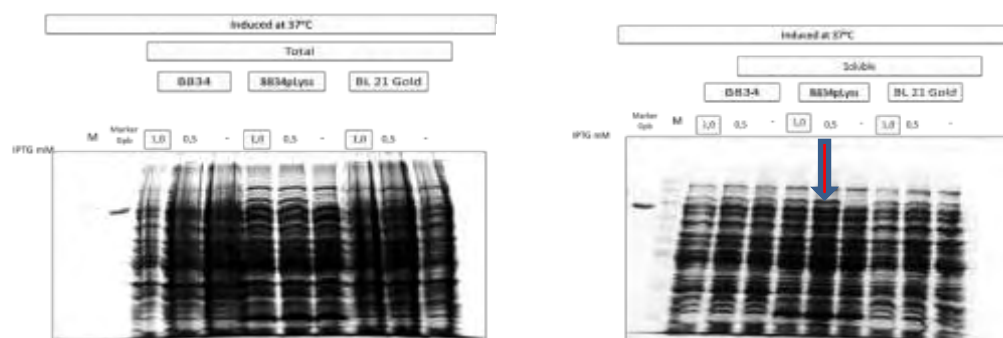
διαμόρφωση των πηκτών είναι τέτοια ώστε να μπορούν να συγκριθούν τα Total μεταξύ τους και τα Soluble μεταξύ τους.



Εικόνα 4.1 Ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμίδιου του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης His-hlGPb από βακτήρια E.coli, στελέχους BL 21 Gold (DE3) και B834 (DE3) και επαγωγή της υπερέκφρασης στους 37°C και 25°C. Συκρίνονται τα Total μεταξύ τους και τα Soluble μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης σε πηκτή ακρυλαμίδιου δεν παρουσιάζουν το επιθυμητό αποτέλεσμα της υπερέκφρασης, ούτε στο διαλυτό (soluble) ούτε στο αδιάλυτο (total) κομμάτι. M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hlGPb.

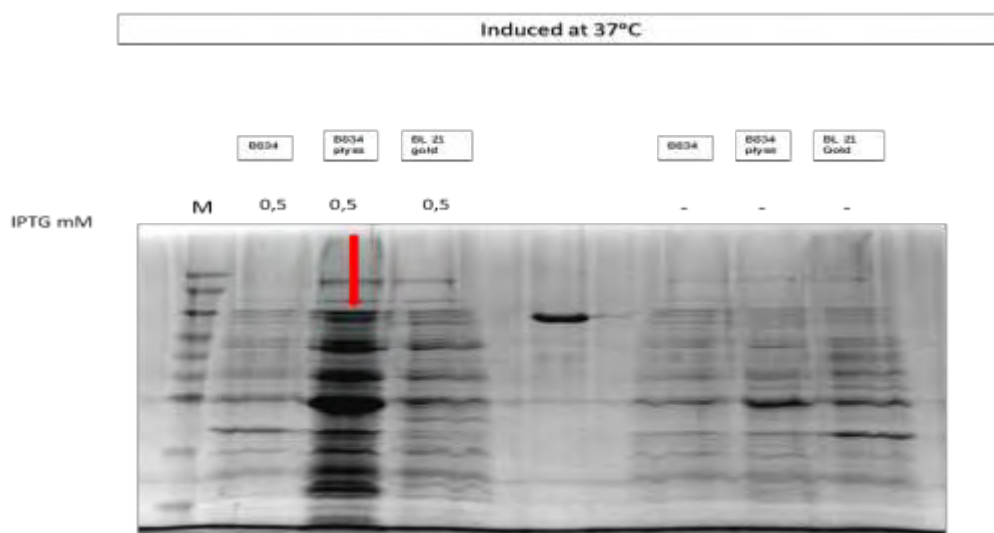
4.2.1.2. Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (BL 21 Gold, B834, B834plysS)

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος στις κυτταρικές σειρές BL 21 Gold, B834 και B834plysS. Καλλιέργειες των 150ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB Broth (Applichem) [50μg/ml πυριδοξίνη, 2.5mM MnCl₂] επωάστηκαν μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν OD_{600nm}= 0.7 Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Κάθε καλλιέργεια διαιρέθηκε σε σωλήνες τύπου falcon από 50ml και ακολούθησε η επαγωγή στους 37°C για 4h. Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις 0mM, 0.5mM και 1mM (Εικόνα 4.2). Στα στελέχη BL 21 και Gold B834 παρατηρήθηκε πρόβλημα καθώς η ανάπτυξη ήταν μη φυσιολογική. Ο έλεγχος συνεχίζεται όπως και παραπάνω.



Εικόνα 4.2 Ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμίδιου του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης His-hlGPb από βακτήρια *E.coli*, στελέχους BL 21 Gold (DE3), B834 (DE3) και B834plyss και επαγωγή της υπερέκφρασης στους 37°C. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης σε πηκτή ακρυλαμίδιου δεν παρουσιάζουν το επιθυμητό αποτέλεσμα της υπερέκφρασης, ούτε στο διαλυτό (soluble) ούτε στο αδιάλυτο (total) κομμάτι. Αν και στην κυτταρική σειρά B834plyss φαίνεται πως η έκφραση είναι σε μεγαλύτερα επίπεδα, ειδικά στο διαλυτό με 0.5mM IPTG. Συγκρίνονται τα Total μεταξύ τους και τα Soluble μεταξύ τους. M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hlGPb.

Για τις παραπάνω συνθήκες πραγματοποιήθηκε και μεσαίας κλίμακας απομόνωση της ανασυνδυασμένης His-hlGPb με σφαιρίδια Ni-NTA Agarose (βλ. 3.2.4.3.) όπου χρησιμοποιήθηκαν 2ml από τα Soluble (0mM IPTG και 0.5mM IPTG) και τα αποτελέσματα της ανάλυσης σε πηκτή ακρυλαμίδιου φαίνονται στην εικόνα 4.3.

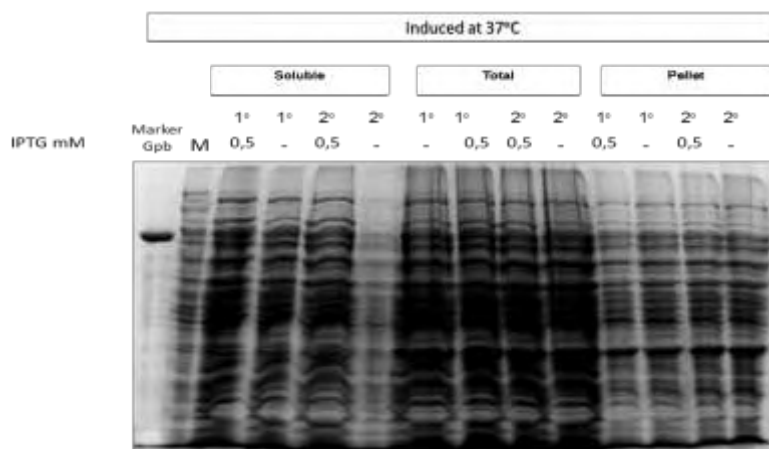


Εικόνα 4.3: Δεν παρατηρείται το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η εικόνα είναι καλύτερη στην κυτταρική σειρά B834plyss. M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hlGPb

4.2.1.3. Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (BL 21 Gold/- $MnCl_2$ 2.4mM $MnCl_2$)

Καλλιέργειες κυττάρων BL 21 Gold των 12ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth (Applichem) 1^ο : [μόνο αντιβιοτικό Ampicillin 100μg/ml], 2^ο : [100μg/ml πυριδοξίνη και 2.4mM $MnCl_2$] επώαστηκαν μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν $OD_{600nm} = 0,7$ A όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Δοκιμάστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις 0mM και 0.5mM IPTG και μόνο μία θερμοκρασία επώασης 37°C. Τέλος, έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λυσης 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 200mM NaCl] και

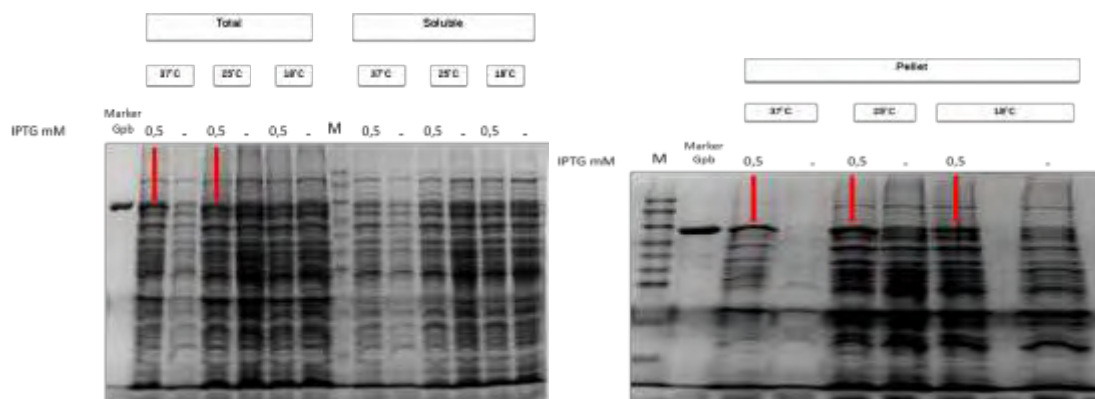
ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10% (εικόνα 4.4). Αναλύθηκαν τα Total, Soluble και τα Pellet.



Εικόνα 4.4: Δεν παρατηρείται το επιθυμητό αποτέλεσμα. Δεν επιτεύχθηκε υπερέκφραση και η ποσότητα της πρωτεΐνης είναι μειωμένη τόσο στο διαλυτό όσο και στο αδιάλυτο κομμάτι. M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hlGPb

4.2.1.4. Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (BL 21 Gold/ 18°C, 25°C, 37°C)

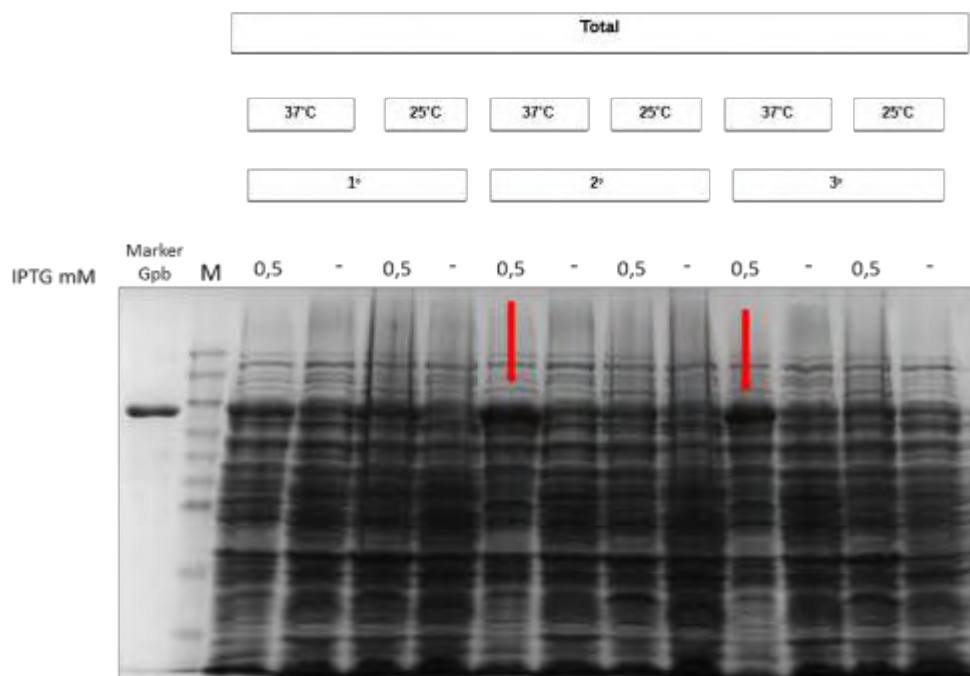
Καλλιέργειες κυττάρων BL 21 Gold των 10ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth (Applichem) [100μg/ml πυριδοξίνη και 4.8mM MnCl₂] επωάστηκαν μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν OD_{600nm} = 0.7. Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε θερμοκρασίες 18°C, 25°C και 37°C και σε συγκεντρώσεις επαγωγέα 0mM IPTG και 0.5mM IPTG. Έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λυσης 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 200mM NaCl] και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10% (εικόνα 4.5). Αναλύθηκαν τα Total, Soluble και τα Pellet.

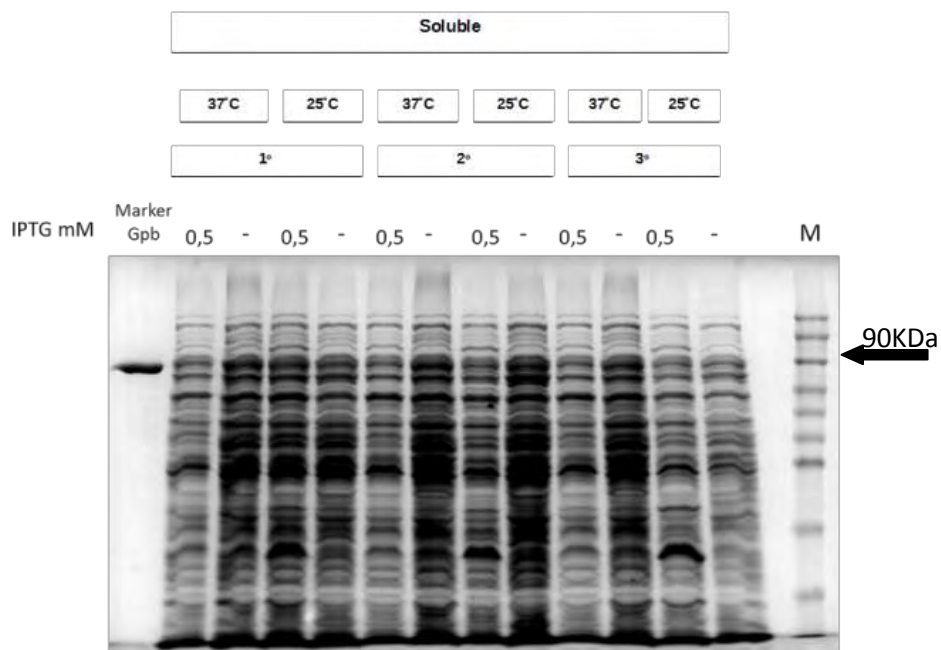


Εικόνα 4.5: Παρατηρείται μικρή αύξηση της hIGP με την προσθήκη επαγωγέα, στο αδιάλυτο κομμάτι. Η πρωτεΐνη εκφράζεται με την μορφή εσώκλειστων σωμάτων. Και πάλι δεν επιτεύχθει υπερέκφραση. M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hIGPb

4.2.1.5. Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (BL 21 Gold/ $MnCl_2$, $MgCl_2$)

Καλλιέργειες κυττάρων BL 21 Gold των 10ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου 2YT με 1° : [100μg/ml πυριδοξίνη και 4.8mM $MnCl_2$] και καλλιέργειες των 10ml θρεπτικού μέσου LB Broth (Applichem) με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις 2° : [100μg/ml πυριδοξίνη, 4.8mM $MnCl_2$, 5mM $MgCl_2$], και 3° : [100μg/ml πυριδοξίνη και 5mM $MgCl_2$], επωάστηκαν μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν $OD_{600nm} = 0.7$ Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε θερμοκρασίες 25°C και 37°C και σε συγκεντρώσεις επαγωγέα 0mM IPTG και 0.5mM IPTG. Έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λυσης 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 200mM NaCl] και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10% (εικόνα 4.6). Η διαμόρφωση της πηκτής ήταν τέτοια ώστε να μπορούν να συγκριθούν τα Total μεταξύ τους και τα Soluble μεταξύ τους. Η ανάλυση έδειξε ότι με την προσθήκη $MgCl_2$ παρατηρείται μια σχετική αύξηση στην έκφραση της πρωτεΐνης όσον αφορά στο αδιάλυτο κομμάτι.

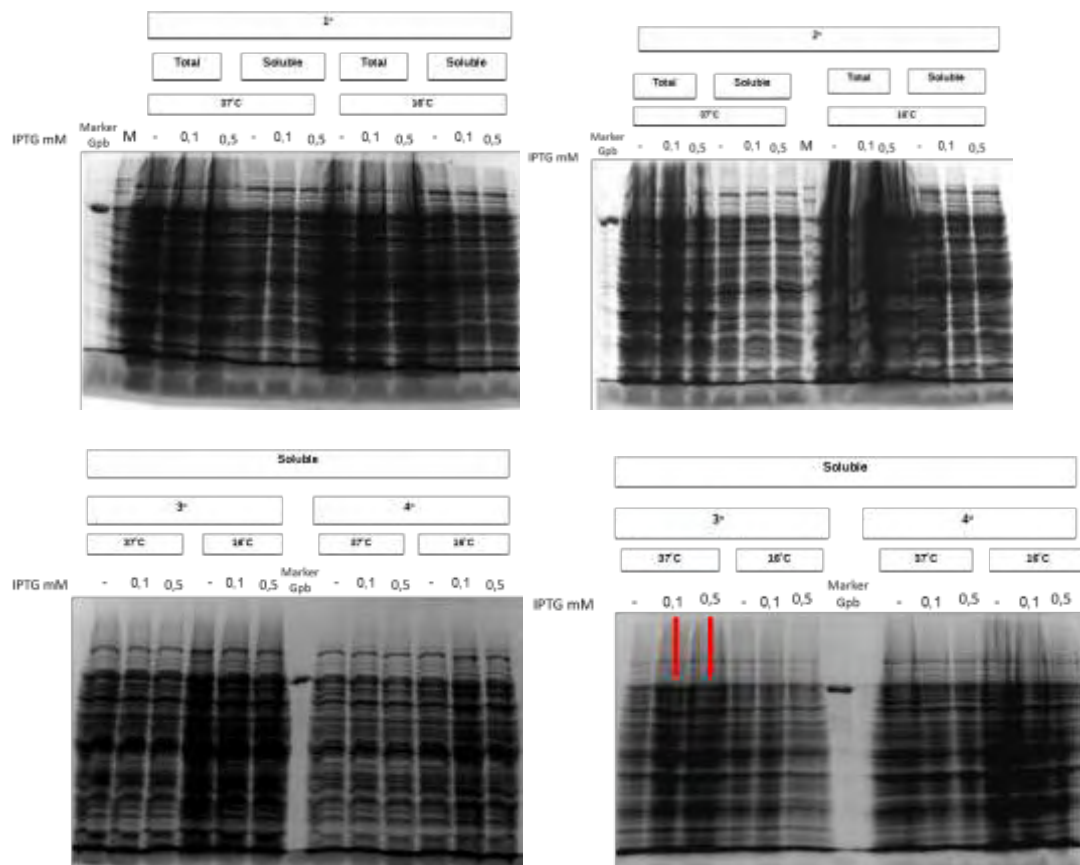




Εικόνα 4.6: Με την προσθήκη $MgCl_2$ (δείγματα 2° και 3° όπως χαρακτηρίζονται παραπάνω) παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση της hIGPb. Η αύξηση όμως παρατηρείται στο αδιάλυτο κομμάτι οπότε συμπεραίνουμε ότι εκφράζεται με την μορφή εσώκλειστων σωμάτων. Και πάλι δεν επετεύχθει υπερέκφραση. M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hIGPb

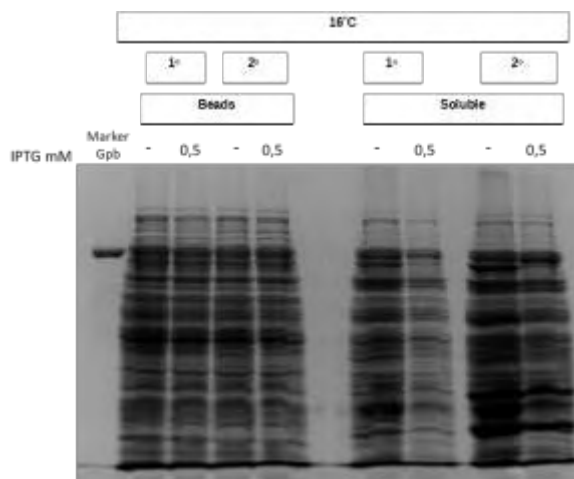
4.2.1.6. Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (BL21 Gold/ 2YT/ $MnCl_2$, $MgCl_2$)

Καλλιέργειες κυττάρων BL 21 Gold των 15ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου 2YT με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις 1^η: [100μg/ml πυριδοξίνη και 4.8mM $MnCl_2$], 2^η: [100μg/ml πυριδοξίνη και 5mM $MgCl_2$], 3^η: [100μg/ml πυριδοξίνη, 4.8mM $MnCl_2$, 5mM $MgCl_2$] και 4^η: [μόνο αντιβιοτικό ampicillin 50μg/ml], επώαστηκαν μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν $OD_{600nm} = 0.7$ Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε θερμοκρασίες 16°C και 37°C και σε συγκεντρώσεις επαγωγέα 0mM IPTG, 0.1mM IPTG και 0.5mM IPTG. Έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λυσης 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 200mM NaCl] και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 10% (εικόνα 4.7).



Εικόνα 4.7: Στις συνθήκες 1^η, 2^η και 4^η, δεν παρατηρείται κάποια διαφορά πριν και μετά την επαγωγή οπότε δεν προωθήθηκε η έκφραση του δικού μας γονιδίου. Στην συνθήκη 3^η στους 37°C υπάρχει διαφορά στα δείγματα πριν και μετά την επαγωγή, αλλά και πάλι δεν επετεύχθει υπερέκφραση. Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hlGPb

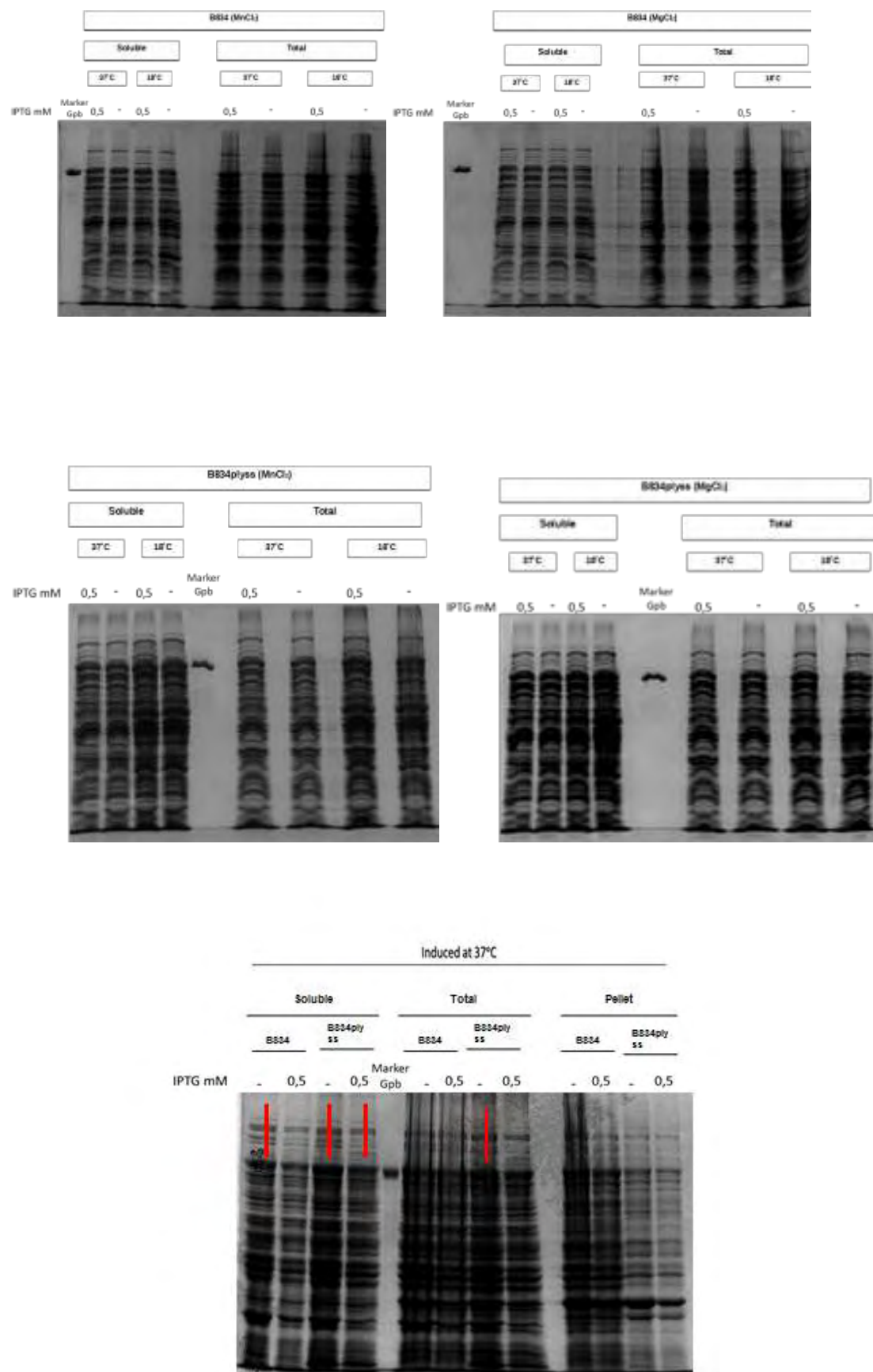
Από τις παραπάνω συνθήκες πραγματοποιήθηκε και μεσαίας κλίμακας απομόνωση της ανασυνδυασμένης His-hlGPb με σφαιρίδια Ni-NTA Agarose (βλ. 3.2.4.3.) για τις συνθήκες 1 και 2 με επαγωγή στους 16°C όπου χρησιμοποιήθηκαν 2ml από τα Soluble (0mM IPTG και 0.5mM IPTG) και τα αποτελέσματα της ανάλυσης σε πηκτή ακρυλαμίδιου φαίνονται στην εικόνα 4.8.



Εικόνα 4.8: Η His-hlGPb δεν προσδέθηκε στα beads Ni^{+2} , όπως αναμενόταν. Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hlGPb

4.2.1.7. Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (B834, B834plysS/ 2YT/ MnCl_2 , MgCl_2)

Καλλιέργειες κυττάρων B834 των 12ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου 2YT με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις 1η: [100μg/ml πυριδοξίνη και 4.8mM MnCl_2], 2η: [100μg/ml πυριδοξίνη και 5mM MgCl_2], 3^η: [100μg/ml πυριδοξίνη, 4.8mM MnCl_2 , 5mM MgCl_2] και καλλιέργειες κυττάρων B834plysS των 12ml θρεπτικού μέσου 2YT με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις 1η: [100μg/ml πυριδοξίνη και 4.8mM MnCl_2], 2η: [100μg/ml πυριδοξίνη και 5mM MgCl_2], 3η: [100μg/ml πυριδοξίνη, 4.8mM MnCl_2 , 5mM MgCl_2] επωάστηκαν μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.7$ Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Για τις συγκεντρώσεις 1 και 2 πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε θερμοκρασίες 18°C και 37°C και σε συγκεντρώσεις επαγωγέα 0mM IPTG και 0.5mM IPTG. Για τις συγκεντρώσεις 3 πραγματοποιήθηκε επαγωγή μόνο στους 37°C και σε συγκεντρώσεις επαγωγέα 0mM IPTG και 0.5mM IPTG. Έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λυσης 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 200mM NaCl] και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10% (εικόνα 4.9).

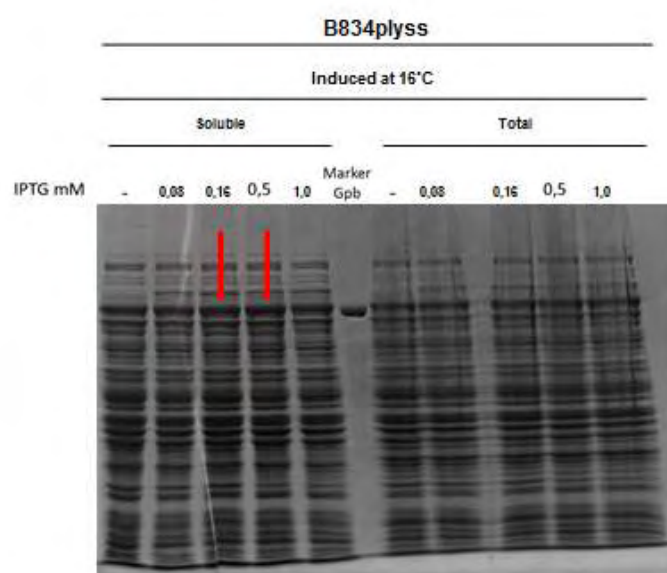


Εικόνα 4.9: Οι δύο πρώτες πηκτές απεικονίζουν τις συνθήκες 1^η και 2^η που εφαρμόστηκαν στην κυτταρική σειρά B834. Δεν υπήρξε υπερέκφραση ούτε και διαφορά πριν την επαγωγή και μετά. Οι

επόμενες δύο πηκτές απεικονίζουν τις συνθήκες 1^η και 2^η που εφαρμόστηκαν στην κυτταρική σειρά B843plysS. Δεν υπήρξε υπερέκφραση ούτε και διαφορά πριν την επαγωγή και μετά. Η τελευταία πηκτή απεικονίζει την 3^η συνθήκη που δοκιμάστηκε και στις δύο κυτταρικές σειρές. Και πάλι δεν επετεύχθει αύξηση της έκφρασης, παρ' όλο που παρατηρείται διαφορά πριν την επαγωγή και μετά. Η αύξηση της έκφρασης όμως εμφανίζεται στα δείγματα πριν την επαγωγή. Συνεπώς η επαγωγή δεν ήταν επιτυχής. Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hlGPb. Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hlGPb

4.2.1.8. Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (B834plysS/ LB Broth χειροποίητο)

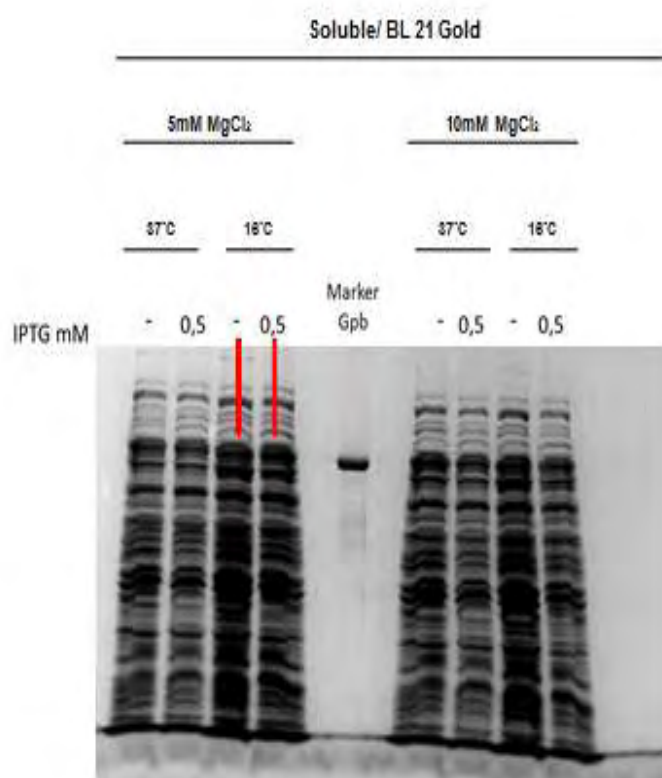
Καλλιέργειες κυττάρων B834plyss 20ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth (χειροποίητο) με συγκεντρώσεις : [100μg/ml πυριδοξίνη, 4.8mM MnCl₂ , 5mM MgCl₂] επωάστηκαν μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν OD_{600nm}= 0.7 Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (*IPTG*). Πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε θερμοκρασία 18°C και σε συγκεντρώσεις επαγωγέα 0mM *IPTG* , 0.08mM *IPTG*, 0.16mM *IPTG*, 0.5mM *IPTG* και 1mM *IPTG*. Έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λυσης 20mM Hepes buffer (ph 7.5), 500mM NaCl, 0.1% Triton-X, 1mM PMSF) και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 10% (εικόνα 4.10).

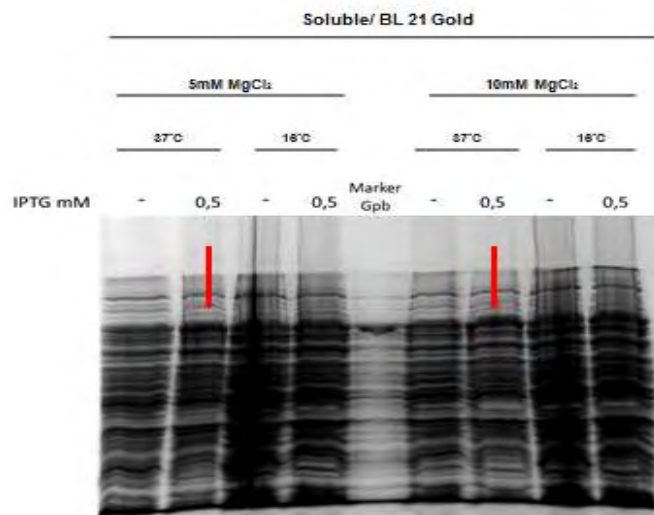


Εικόνα 4.10: Η επαγωγή ήταν περισσότερο επιτυχής για τις συγκεντρώσεις 0.16mM και 0.5mM *IPTG*. Συγκεντρώσεις <0.16mM επαγωγέα μάλλον δεν επαρκούν για να γίνει σωστή επαγωγή. Ενώ σε συγκεντρώσεις >0.5mM, η επαγωγή είναι πάνω από τα όρια, δημιουργώντας και αυτή προβλήματα στην έκφραση του γονιδίου. Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hlGPb. Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hlGPb

4.2.1.9. Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (BL 21 Gold/ 5mM, 10mM MgCl₂)

Καλλιέργειες κυττάρων BL 21 Gold των 12ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth (χειροποίητο) με συγκεντρώσεις 1ο: [100μg/ml πυριδοξίνη και 5mM MgCl₂], 2ο: [100μg/ml πυριδοξίνη και 10mM MgCl₂], επώστηκαν μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν OD_{600nm}= 0.7 Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (*IPTG*). Πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε θερμοκρασίες 16°C και 37°C και σε συγκεντρώσεις επαγωγέα 0mM *IPTG* και 0.5mM *IPTG*. Έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λυσης 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 200mM NaCl, 1mM PMSF, 0.1% Triton-X] και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 10% (εικόνα 4.11).

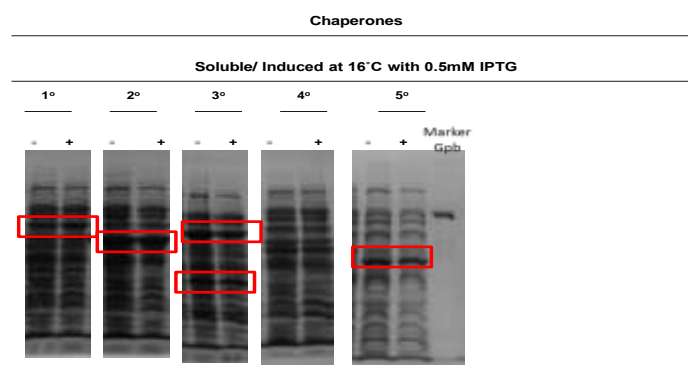
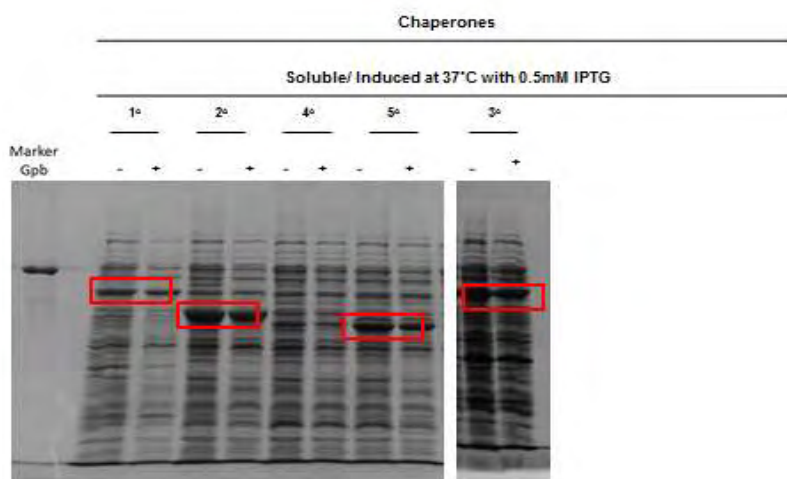
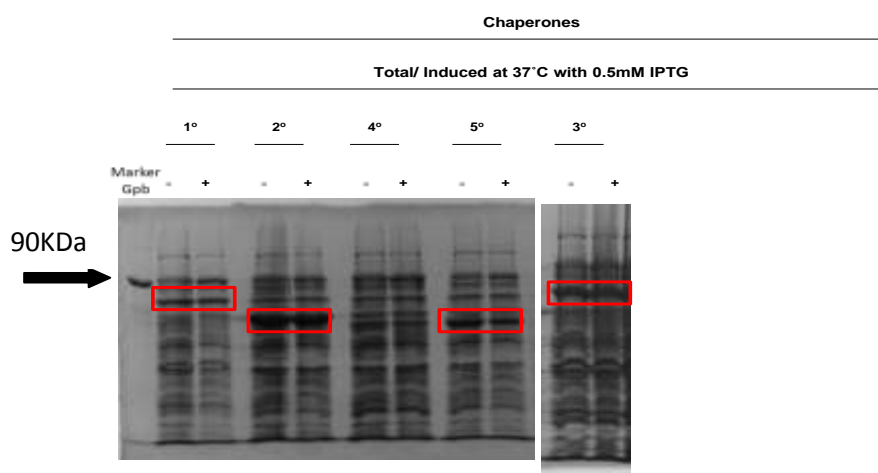




Εικόνα 4.11: Δεν παρατηρείται αλλαγή στην έκφραση όσον αφορά στην συγκέντρωση του $MgCl_2$. Υπήρξε όμως διαφορά στα δείγματα που έγινε επαγωγή. Η έκφραση αυξήθηκε σε σχέση με τα δείγματα στα οποία δεν προστέθηκε επαγωγέας. Ίσως η προσθήκη $MgCl_2$ να βοηθάει περισσότερο την έκφραση της hIGP σε διαλυτή μορφή. Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hIGPb

4.2.1.10. Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (Chaperones)

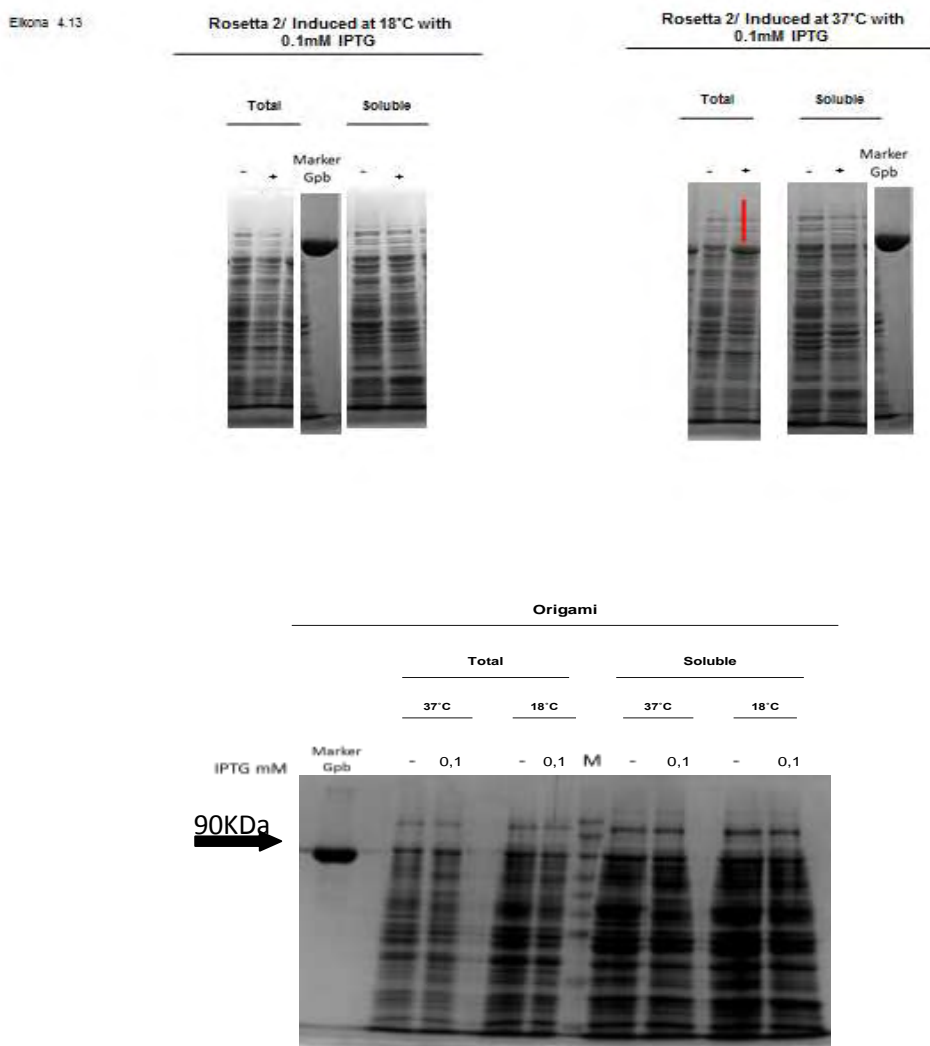
Πραγματοποιήθηκαν μελέτες συνέκφρασης της hIGPb μετά από μετασχηματισμό βακτηριακών συστημάτων έκφρασης με τη μέθοδο ηλεκτροδιάτρησης (*electroporation*), που εκφράζουν και τους μοριακούς συνοδούς (chaperones) DnaK-DnaJ-GrpE, GroEL-GroES και tig (βλ. 3.2.3.). Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα 1° :pG-KJE8, 2° :pGro7, 3° : pKJE7, 4° : pG-Tf2 και 5° : pTf16 τα οποία αποτελούν μέρος του Chaperone plasmid set(Takara) και αναπτύχθηκαν από το HSP Research Institute, Inc. (3.1.3.). Υγρές καλλιέργειες των 15ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth (χειροποίητο) με συγκεντρώσεις: [100μg/ml πυριδοξίνη και 4.8mM $MnCl_2$], επώαστηκαν μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν $OD_{600nm} = 0.7$ Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε θερμοκρασίες 18°C και 37°C και σε συγκεντρώσεις επαγωγέα 0mM IPTG και 0.5mM IPTG. Έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λυσης 50mM Tris-HCl buffer (ph 7.5), 200mM NaCl] και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 10% (εικόνα 4.12).



Εικόνα 4.12: Η επαγωγή ήταν επιτυχής καθώς τα chaperones εκφράστηκαν κανονικά (για τα μοριακά βάρη των chaperones φαίνονται στην εικόνα 9) Δεν κατάφεραν όμως να βοηθήσουν την έκφραση της hIGP στο διαλυτό κομμάτι, αφού στις πηκτές δεν φαίνεται πουθενά βελτιστοποίηση στην έκφρασή της. Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hIGPb

4.2.1.11. Μελέτες έκφρασης στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο (*Rosetta*, *Origami*)

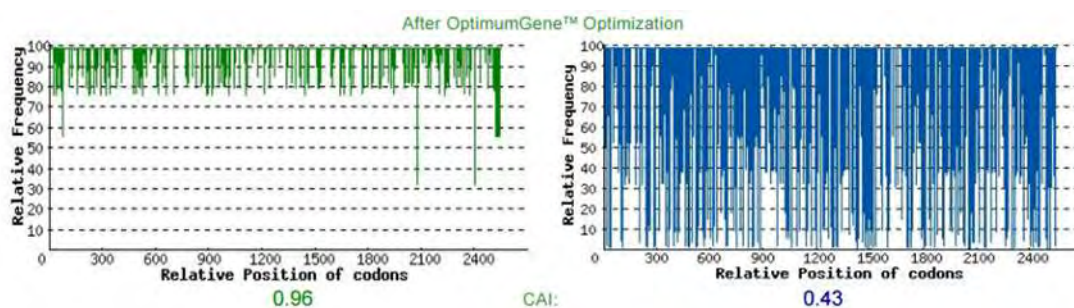
Καλλιέργειες κυττάρων *Rosetta* 2 (DE3) και *Origami* και 10ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth (χειροποίητο) με συγκεντρώσεις : [100μg/ml πυριδοξίνη και 4.8mM MnCl₂] επωάστηκαν μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν OD_{600nm} = 0.7 Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (*IPTG*). Πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε θερμοκρασία 18°C και 37°C και σε συγκεντρώσεις επαγωγέα 0mM *IPTG* και 0.1mM *IPTG*, 0.5mM *IPTG* για τα *Rosetta* 2 και 0mM *IPTG*, 0.1mM *IPTG* για τα *Origami* . Έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λυσης 20mM Hepes buffer (ph 7.5), 500mM NaCl, 5mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Triton-X, 1mM PMSF] και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 10% (εικόνα 4.13).



Εικόνα 4.13: Και με αυτές τις κυτταρικές σειρές δεν βελτιώθηκε η έκφραση και η διαλυτότητα της hIGPb. M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hIGPb

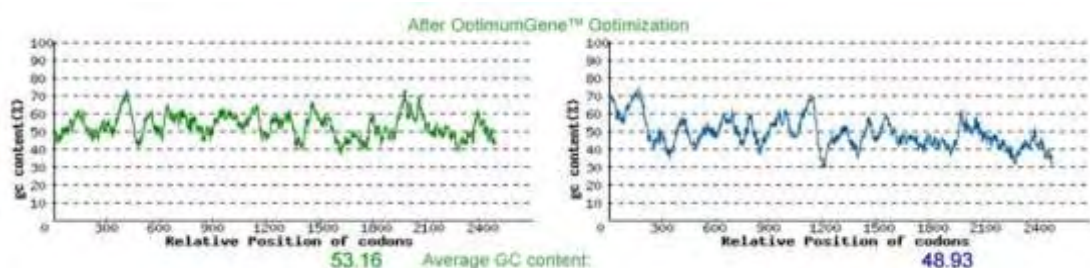
4.2.2. Βελτιστοποίηση γονιδίου

Τα προβλήματα στην έκφραση της hIGP οδήγησαν σε ανάλυση του γονιδίου της (PYGL), με διάφορους αλγόριθμους βελτιστοποίησης της συχνότητας εμφάνισης σπάνιων κωδικονίων. Το γονίδιο φέρει μεγάλο ποσοστό σπάνιων κωδικονίων και για αυτό η έκφραση του από το βακτήριο E.coli, ήταν χαμηλής απόδοσης ή εκφράζοταν σε εσώκλειστα σωματίδια. Ζητήθηκε από εταιρίες σύνθεσης γονιδίων (Genescript και Eurofins) να ελεγχθεί το γονίδιο και να προταθούν τρόποι βελτιστοποίησής του. Σύμφωνα με τον αλγόριθμο OptimumGene™ Genescript, με τη βελτίωση του γονιδίου, το πλαίσιο προσαρμογής κωδικονίων (Codon Adaptation Index CAI) της hIGP στο σύστημα E.coli αναβαθμίζεται από 0.43 σε 0.96. (εικόνα 4.14)



Εικόνα 4.14: Η κατανομή της συχνότητας εμφάνισης σπάνιων κωδικονίων κατά μήκος της αλληλουχίας του γονιδίου PYGL. Ένα CAI της τάξης του 1.0 θεωρείται ιδανικό για το επιθυμητό σύστημα έκφρασης, ενώ ένα CAI > 0.8 θεωρείται αρκετά καλό.

Επίσης το περιεχόμενο σε GC και σε μη αρεστά μοτίβα, βελτιστοποιήθηκαν ώστε να επεκταθεί ο χρόνος ζωής του mRNA. Οι δομές Stem-Loop που επιδρούν στην δέσμευση και στην σταθερότητα του ριβοσώματος τροποποιούνται ώστε να αποτραπούν οι αρνητικές επιπτώσεις στο γονίδιο (εικόνα 4.15)



Εικόνα 4.15: Το ιδανικό ποσοστιαίο φάσμα του περιεχομένου σε GC είναι μεταξύ 30-70%. Περιοχές με %GC σε περιοχή ανάγνωσης 60bp αφαιρείται για να βελτιωθεί το γονίδιο.

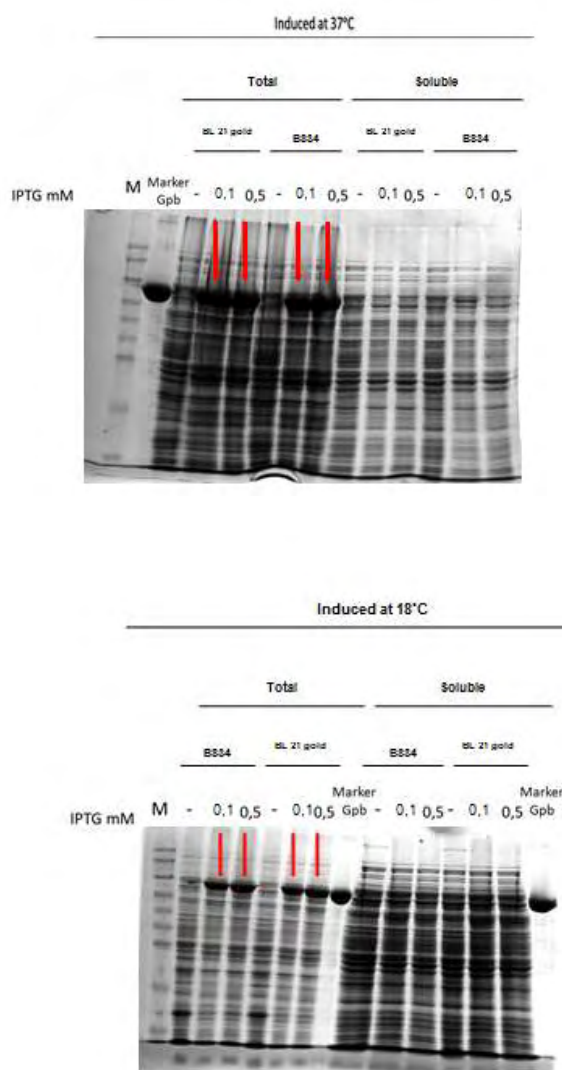
Τελικά επιλέχθηκε η βελτιστοποίηση του γονιδίου από την εταιρία Eurofins. Μελετήθηκαν και τροποποιήθηκαν όλα τα αρνητικά μοτίβα του γονιδίου, αντικαταστάθηκαν πολλά από τα σπάνια κωδικώνια με σιωπηλή μετάλλαξη και βελτιώθηκε το περιεχόμενο σε GC. Σαν τελικό αποτέλεσμα συντέθηκε ένα νέο βελτιστοποιημένο γονίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη hIGP, ως φορέας κλωνοποίησης επιλέχθηκε ο pET-M11 και η απόδοση της έκφρασης αυξήθηκε κατά πολύ. Στο παράρτημα 1 παραθέτονται οι αναφορές που σχετίζονται με την βελτιστοποίηση του γονιδίου.

4.2.3. Μελέτες έκφρασης βελτιστοποιημένου γονιδίου (πλασμιδιακός φορέας pET-M11)

Σε όλες τις μελέτες που αφορούσαν το βελτιστοποιημένο γονίδιο χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο LB Broth χειροποίητο, αντιβιοτικό Kanamycin σε τελική συγκέντρωση 20μg/ml καθώς το γονίδιο είχε εισαχθεί σε φορέα έκφρασης pET-M11 που φέρει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, πυριδοξίνη σε συγκέντρωση 100μg/ml και τέλος MnCl₂ σε συγκέντρωση 4.8mM.

4.2.3.1. Μελέτες έκφρασης βελτιστοποιημένου γονιδίου(BL 21 Gold, B834/ 18°C, 37°C/ 0.0mM, 0.1mM, 0.5mM IPTG)

Καλλιέργειες κυττάρων BL 21 Gold και B834 10ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου επωάστηκαν στους 37°C /210rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα καλλιέργειας OD_{600nm}= 0.7 Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε θερμοκρασία 18°C και 37°C και σε συγκεντρώσεις επαγωγέα 0mM IPTG, 0.1mM IPTG και 0.5mM IPTG. Έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λυσης 20mM HEPES buffer (pH 7.5), 500mM NaCl, 0.1% Triton-X, 1mM PMSF] και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδου πυκνότητας 10% (εικόνα 4.16).

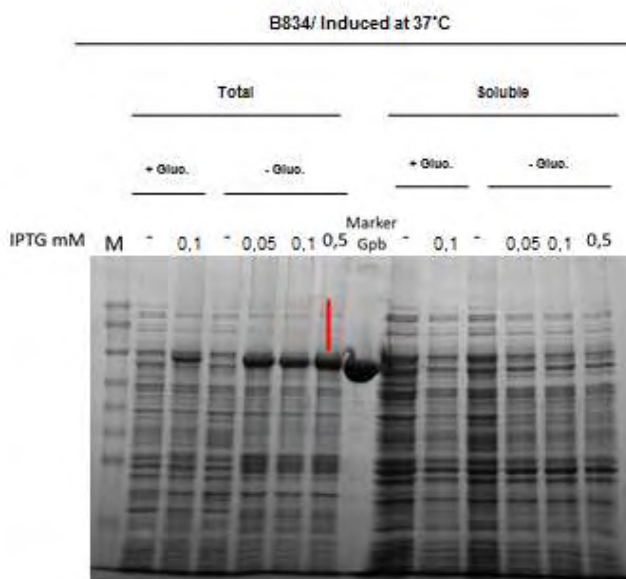


Εικόνα 4.16: Μετά την βελτιστοποίηση του γονιδίου επιτεύχθηκε υπερέκφραση. Η hIGPb υπερκφράζεται μεν, στο αδιάλυτο μέρος δε. Η δράση του επαγωγέα είναι σημαντικά ορατή καθώς στα δείγματα που προστέθηκε επαγωγέας, η hIGPb αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό των εκφραζόμενων πρωτεϊνών. Επίσης οι πηκτές επιδεικνύουν ότι στους 18°C η έκφραση στο διαλυτό προωθείται καλύτερα. M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hIGPb

4.2.3.2. Μελέτες έκφρασης βελτιστοποιημένου γονιδίου(+Glucose/-Glucose)

Καλλιέργειες κυττάρων B834 και 10ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου επωάστηκαν στους 37°C /210rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα καλλιέργειας $OD_{600nm} = 0.7$ Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε θερμοκρασία 37°C και μελετήθηκε η έκφραση παρουσία γλυκόζης και απουσία της. Οι συγκεντρώσεις του

επαγωγέα για το δείγμα 1^ο : παρουσία γλυκόζης ήταν 0mM *IPTG* και 0.1mM *IPTG*, ενώ για το δείγμα 2^ο : απουσία γλυκόζης οι συγκεντρώσεις του επαγωγέα ήταν 0mM *IPTG*, 0.05mM *IPTG*, 0.1mM *IPTG* και 0.5mM *IPTG* . Έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λυσης 20mM Hepes buffer (ph 7.5), 500mM NaCl, 5mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Triton-X, 1mM PMSF] και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10% (εικόνα 4.17).

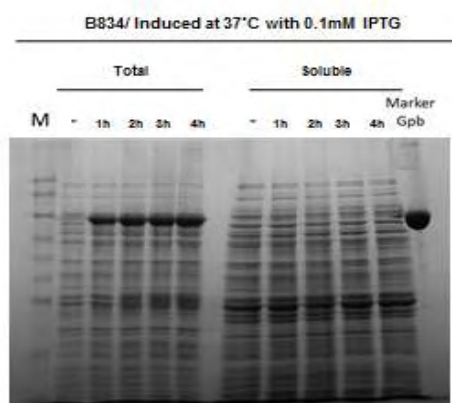


Εικόνα 4.17: Η δοκιμή της έκφρασης ήταν επιτυχής. Η παρουσία της γλυκόζης θα πρέπει να καταστέλλει την έκφραση της hIGP, όπως και έγινε. Επίσης η επαγωγή με σύγκέντρωση 0.5mM *IPTG* δίνει την καλύτερη δυνατή απόδοση στην έκφραση της hIGPb απουσία γλυκόζης. M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hIGPb

4.2.3.3. Μελέτες έκφρασης βελτιστοποιημένου γονιδίου(B834/ induction per hour)

Πραγματοποιήθηκε μελέτη σε καλλιέργεια κυττάρων B834, ώστε να ελεγχθεί η απόδοση της επαγωγής με το πέρασμα της ώρας. Καλλιέργεια των 60ml θρεπτικού μέσου επώαστηκε στους 37°C /210rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα καλλιέργειας $OD_{600nm} = 0.7$ A. Στο σημείο αυτό και πριν πραγματοποιηθεί η επαγωγή, το πρώτο δείγμα όγκου 10ml αφαιρέθηκε από τη συνολική καλλιέργεια και φυγοκεντρήθηκε ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο. Συνεχίστηκε η επαγωγή στους 37°C και με συγκέντρωση 0.1mM *IPTG*. Για κάθε μία ώρα αφαιρούνταν 10ml από την συνολική καλλιέργεια μέχρι και να συμπληρωθούν 4h. Τελικά

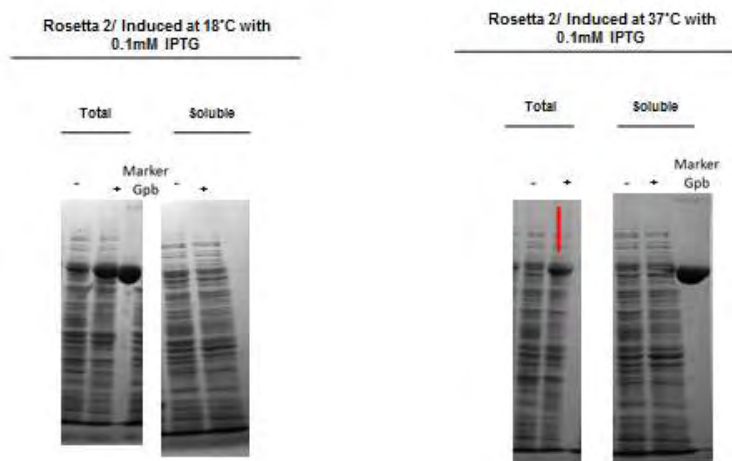
υπήρξαν πέντε δείγματα προς ανάλυση: (-), 1h, 2h, 3h, και 4h. Έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λυσης 20mM Hepes buffer (ph 7.5), 500mM NaCl, 5mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Triton-X, 1mM PMSF] και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 10% (εικόνα 4.18).



Εικόνα 4.18: Η επαγωγή αυξάνεται σταδιακά με το πέρασμα της ώρας. Επιβεβαιώνεται ότι η κατάλληλη διάρκεια της επαγωγής βρίσκεται μεταξύ των 3 με 4 ωρών. M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hlGPb

4.2.3.4. Μελέτες έκφρασης βελτιστοποιημένου γονιδίου (Rosetta)

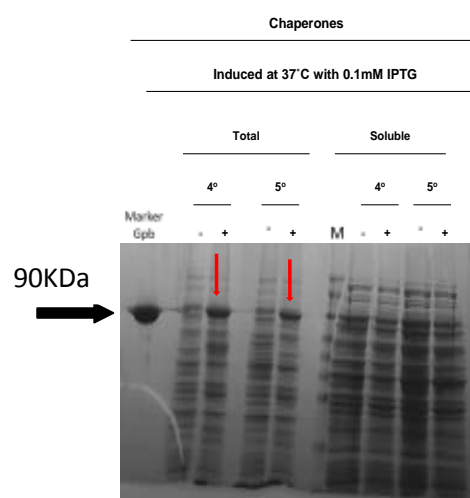
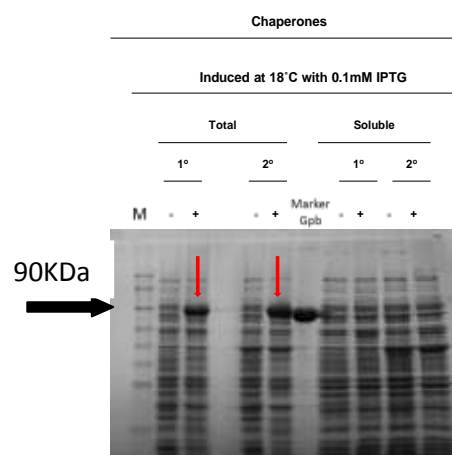
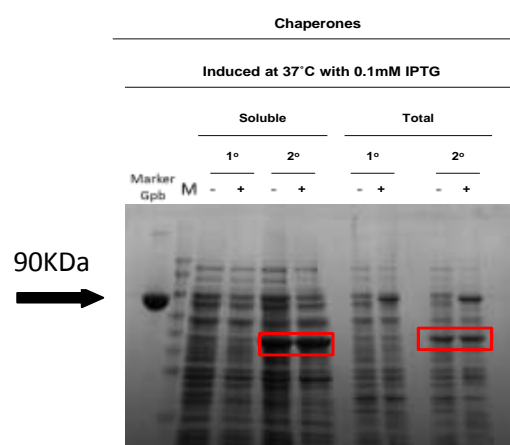
Πραγματοποιήθηκε μελέτη σε καλλιέργεια κυττάρων Rosetta 2. Καλλιέργειες των 10ml θρεπτικού μέσου επώαστηκαν στους 37°C /210rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα καλλιέργειας $OD_{600nm} = 0.7$ A στους 37°C /210rpm όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε θερμοκρασία 18°C και 37°C και σε συγκεντρώσεις επαγωγέα 0mM IPTG και 0.1mM IPTG. Έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λυσης 20mM Hepes buffer (ph 7.5), 500mM NaCl, 0.1% Triton-X, 1mM PMSF] και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 10% (εικόνα 4.19).

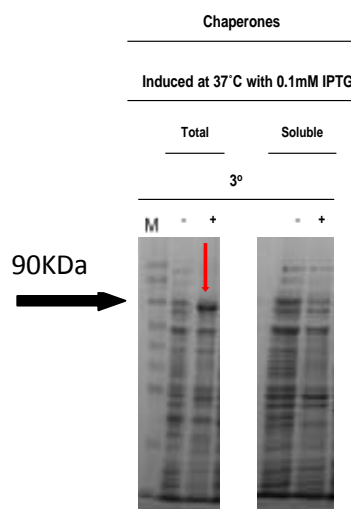


Εικόνα 4.19: Παρατηρείται υπερέκφραση αλλά και πάλι στο αδιάλυτο κομμάτι. Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hlGPb

4.2.3.5. Μελέτες έκφρασης βελτιστοποιημένου γονιδίου(Chaperones)

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες συνέκφρασης της hlGPb μετά από μετασχηματισμό βακτηριακών συστημάτων έκφρασης με τη μέθοδο ηλεκτροδιάτρησης (*electroporation*), που εκφράζουν και τους μοριακούς συνοδούς (chaperones) DnaK-DnaJ-GrpE, GroEL-GroES και tig (βλ. 3.2.3.) . Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα 1ο :pG-KJE8, 2ο :pGro7, 3ο : pKJE7, 4ο : pG-Tf2 και 5ο : pTf16 τα οποία αποτελούν μέρος του Chaperone plasmid set(Takara) και αναπτύχθηκαν από το HSP Research Institute, Inc. (3.1.3.). Υγρές καλλιέργειες των 10ml θρεπτικού μέσου LB Broth με συγκεντρώσεις: [100μg/ml πυριδοξίνη και 4.8mM MnCl₂], επωάστηκαν μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν OD_{600nm}= 0.7 Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (*IPTG*). Πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε θερμοκρασίες 18°C και 37°C και σε συγκεντρώσεις επαγωγέα 0mM *IPTG* και 0.1mM *IPTG*. Έγινε λύση των κυττάρων [σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 20mM HEPES buffer (pH 7.5), 200mM NaCl] και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 10% (εικόνα 4.20).





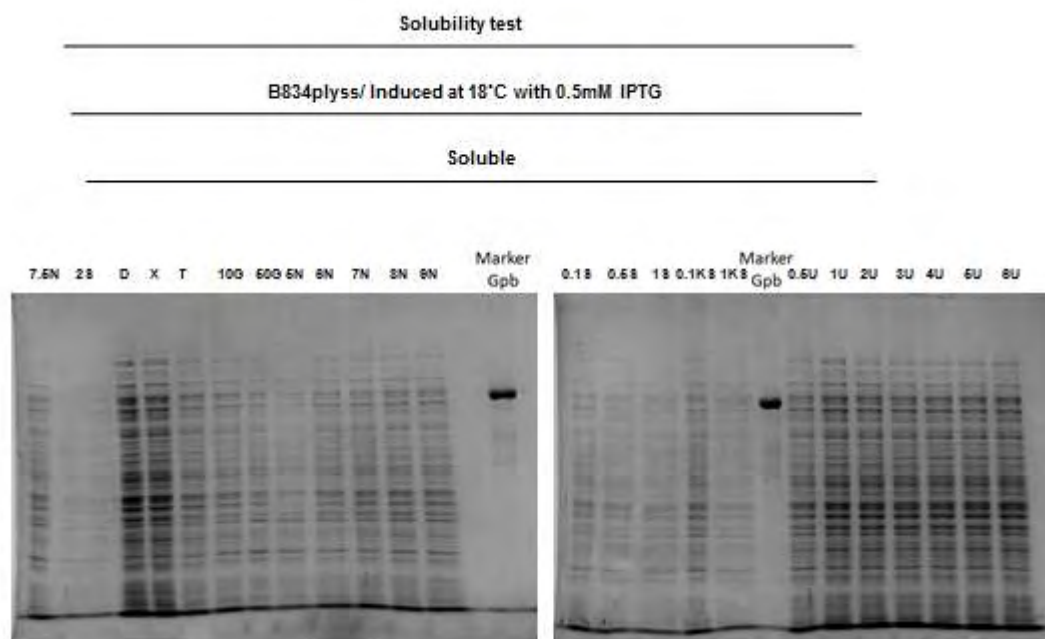
Εικόνα 4.20: Με την συνέκφραση η πρωτεΐνη υπερεκφράζεται, ειδικά με τα chaperones 1^ο και 2^ο αλλά και πάλι εκφράζεται σε έγκλειστα σωμάτια. Ούτε και οι μοριακοί συνοδοί κατάφεραν να προωθήσουν την σωστή αναδίπλωση της hIGPb, ώστε να είναι διαλυτή. (για τα μοριακά βάρη των chaperones βλ. εικόνα 9) M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hIGPb

4.3. Μελέτες βελτιστοποίησης διαλυτότητας hIGPb

4.3.1. Μελέτες βελτιστοποίησης διαλυτότητας hIGPb στο μη-βελτιστοποιημένο γονίδιο

Υγρή καλλιέργεια κυττάρων B834plyss αναπτύχθηκε σε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB Broth (χειροποίητο), επώαστηκε στους 37°C /210rpm μέχρι οπτική πυκνότητα OD_{600nm}= 0.7 Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε θερμοκρασία 18°C και σε συγκέντρωση επαγωγέα 0.5mM IPTG. Η αρχική καλλιέργεια διαιρέθηκε σε σωλήνες τύπου erpendorf του 1.5ml, από 1ml καλλιέργειας, φυγοκεντρήθηκαν στις 5.000rpm/4°C/5min και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Πραγματοποιήθηκε λύση των pellet με τα αντίστοιχα διαλύματα (βλ. 3.1.8.2. ρυθμιστικά

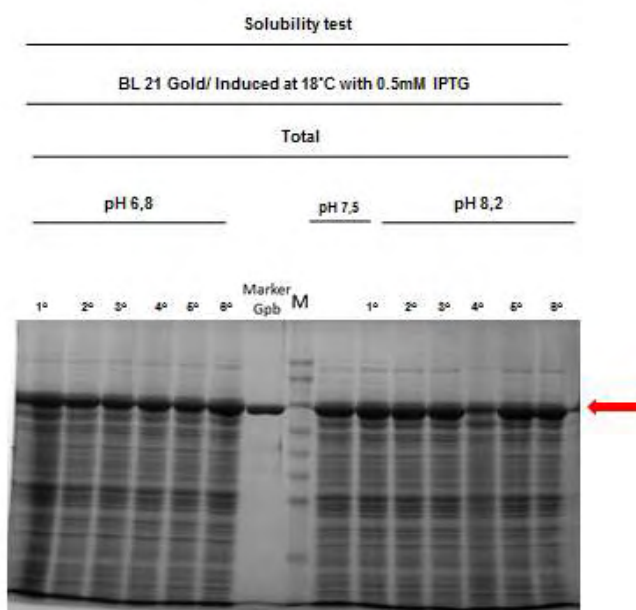
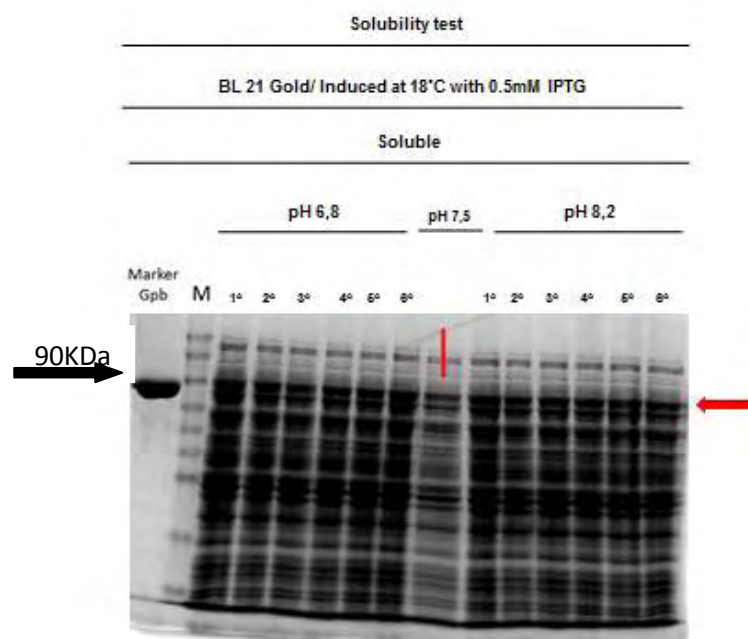
διαλύματα βελτίωσης διαλυτότητας 1) και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 10%. (εικόνα 4.21)



Εικόνα 4.21: Η διαλυτότητα δεν βελτιώθηκε για καμία από τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hIGPb

4.3.2. Μελέτες βελτιστοποίησης διαλυτότητας hIGPb στο βελτιστοποιημένο γονίδιο

Υγρή καλλιέργεια κυττάρων BL 21 Gold αναπτύχθηκε σε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο και επωάστηκε στους 37°C /210rpm μέχρι οπτική πυκνότητα $OD_{600nm} = 0.7$ Α όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε θερμοκρασία 18°C και σε συγκέντρωση επαγωγέα 0.5mM IPTG. Η αρχική καλλιέργεια διαιρέθηκε σε σωλήνες τύπου *erpendorf* του 1.5ml, από 1ml καλλιέργειας, φυγοκεντρήθηκαν στις 5.000rpm/4°C/5min και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Πραγματοποιήθηκε λύση των pellet με τα αντίστοιχα διαλύματα (βλ. 3.1.8.3. ρυθμιστικά διαλύματα βελτίωσης διαλυτότητας 2) και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 10%. (εικόνα 4.22)

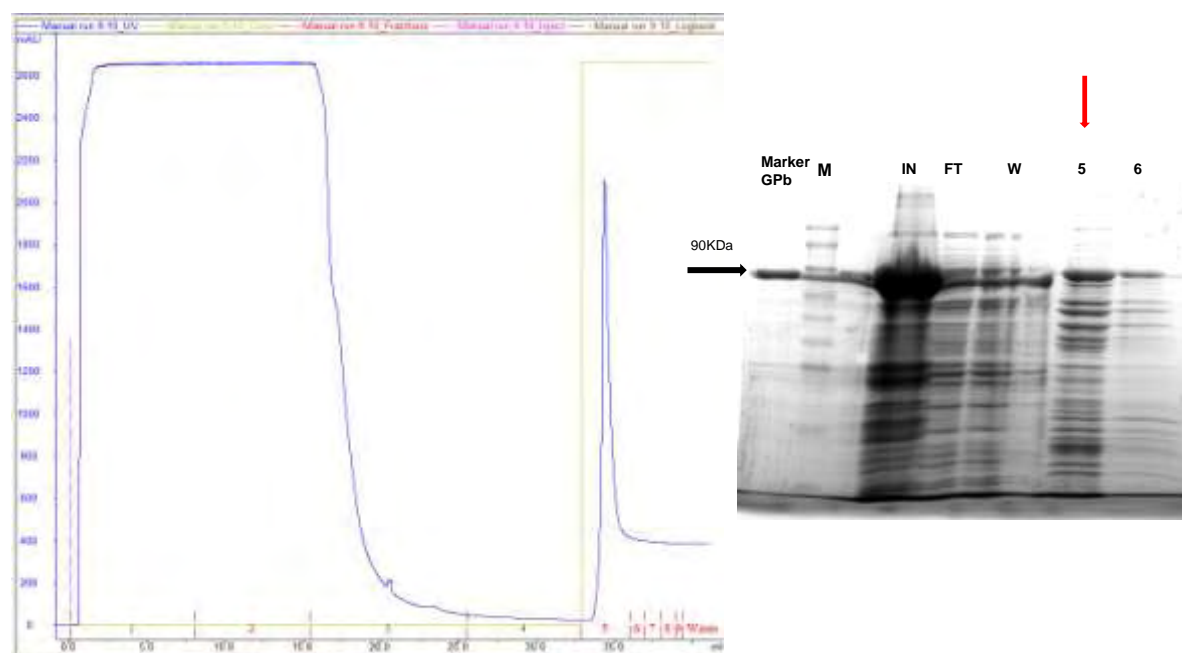


Εικόνα 4.22: Με την αλλαγή του pH και δοκιμάζοντας διάφορες συνθήκες επιτεύχθει η υπερεκφρασμένη hIGPb να είναι στη διαλυτή μορφή της. Για pH 6.8 και pH 8.2 η hIGPb είναι διαλυτή, ενώ σε pH 7.5 η διαλυτότητά της είναι μειωμένη. M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hIGPb

4.4. Καθαρισμός και απομόνωση της *hIGPb*

Στο πρώτο στάδιο της απομόνωσης και του καθαρισμού της hIGPb το διάλυμα λύσης άλλα και το διάλυμα εξισορρόπησης στήλης A περιέχουν : 20mM Phosphate buffer (βλ.

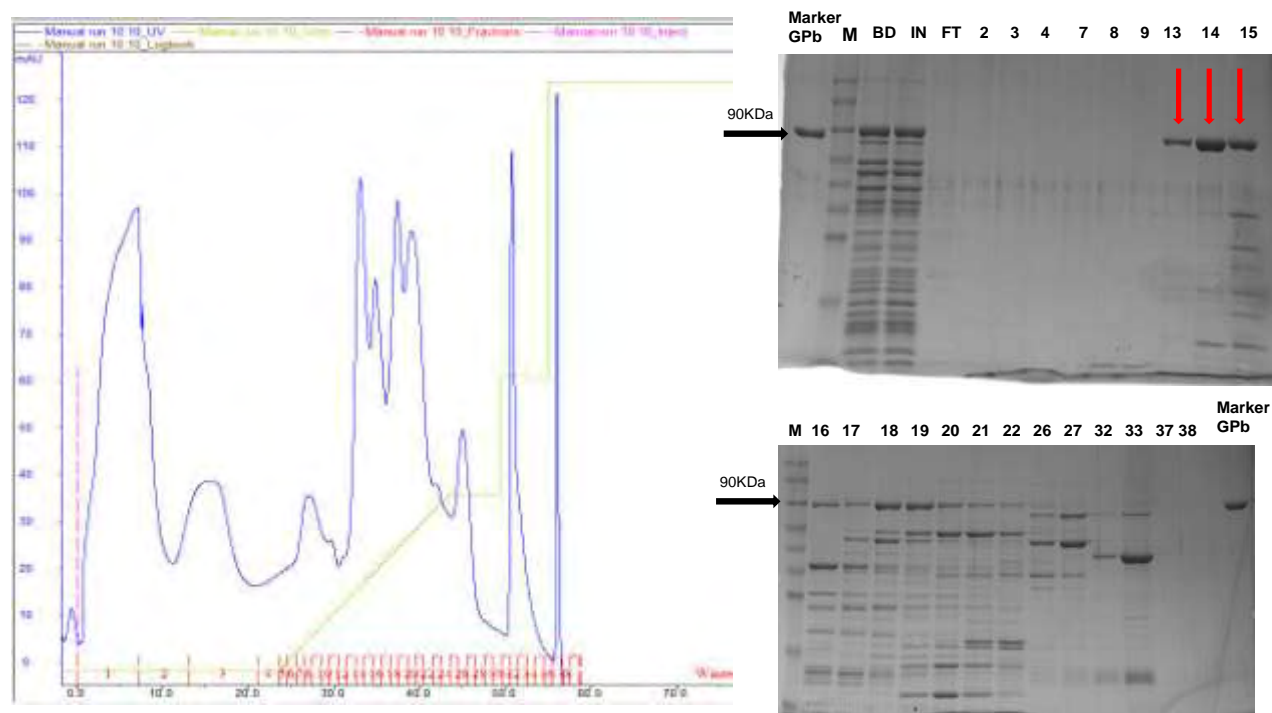
3.1.8.4. το διάλυμα 2^ο), 0.5M NaCl και 20mM Imidazole. Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι η HisTrapHP και ήταν διαθέσιμη από την εταιρία GE Healthcare και η απομόνωση και ο καθαρισμός συνεχίζει όπως έχει αναφερθεί στην ενότητα 3.2.9. Στο δείγμα, πριν φορτωθεί στην super loor, προστέθηκε 0.2mg/ml lysozyme, 1μl βενζονάση και 0.2mM DTT. Η λύση των κυττάρων με υπερήχους έγινε σε 1 κύκλο εύρους 70%, επί 4min και με παύσεις 15 sec. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 1h στους 4°C/35.000xg. Στην Εικόνα 4.23, παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα από SDS PAGE πυκνότητας 10 %. Τα κλάσματα που εκλούστηκαν και περιέχουν την hIGPb ήταν τα 5 και 6.



Εικόνα 4.23: Από το χρωματογράφημα φαίνεται ότι τα κλάσματα στα οποία εκλούστηκε η hIGPb είναι τα 5 και 6. Αναλύθηκαν σε πηκτή 10% ώστε να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα. Ροζ γραμμή: η αρχή εισαγωγής του δείγματος, Πράσινη γραμμή: η συγκέντρωση άλατος M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hIGPb, IN: το αρχικό δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη (In put), FT: ότι δεν κατάφερε να προσδεθεί στη στήλη (flow through), W: το κλάσμα εκπλύσης της στήλης (wash)

Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε αλλαγή στο pH των κλασμάτων που εκλούστηκαν από την πρώτη στήλη (κλάσματα 5 και 6), από pH 7 σε pH 8. Η αλλαγή έγινε με το dialysis buffer (pH 8). Το δείγμα τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης και αφέθηκε να αναδεύεται για 14h σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε περίσσεια του dialysis buffer. Οι πόροι της μεμβράνης επιτρέπουν την σταδιακή αλλαγή των buffer. Εν ακολούθως πραγματοποιήθηκε διαύγαση του δείγματος με φυγοκέντρηση στα 30.000xg/4°C για 30min.

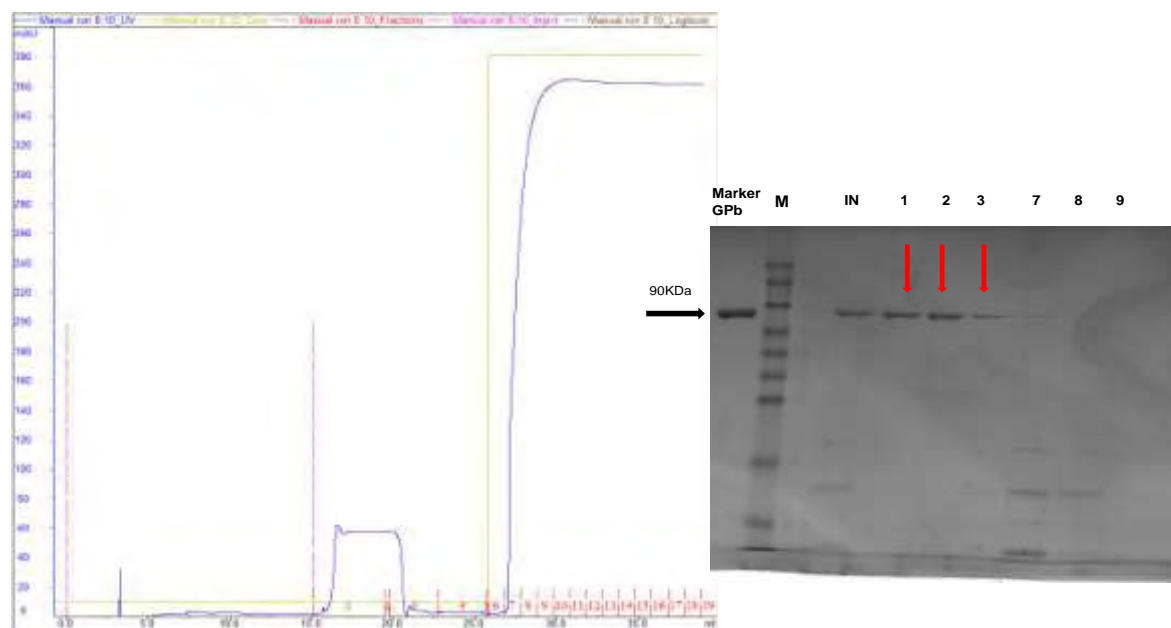
Μετά τη διαύγαση, το δείγμα φορτώθηκε σε στήλη super loor και η απομόνωση και ο καθαρισμός συνεχίστηκε με χρωματογραφία ιονανταλλαγής (βλ. 3.2.11.). Στην Εικόνα 4.24, παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα από SDS PAGE πυκνότητας 10 %. Εκλούστηκαν πολλά κλάσματα αλλά είναι φανερό ότι η hIGPb βρίσκεται στα κλάσματα 13,14,15.



Εικόνα 4.24: Σύμφωνα με το χρωματογράφημα εκλούστηκαν πολλά κλάσματα, οπότε πραγματοποιήθηκε ανάλυση των κλασμάτων σε πηκτή 10% ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η hIGPb βρίσκεται στα κλάσματα 13,14,15. Ροζ γραμμή: η αρχή εισαγωγής του δείγματος, Πράσινη γραμμή: η συγκέντρωση άλατος. M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hIGPb, IN: το αρχικό δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη (In put), FT: ότι δεν κατάφερε να προσδεθεί στη στήλη (flow through), W: το κλάσμα εκπλύσης της στήλης (wash), BD: το δείγμα μετά τη διαύγαση.

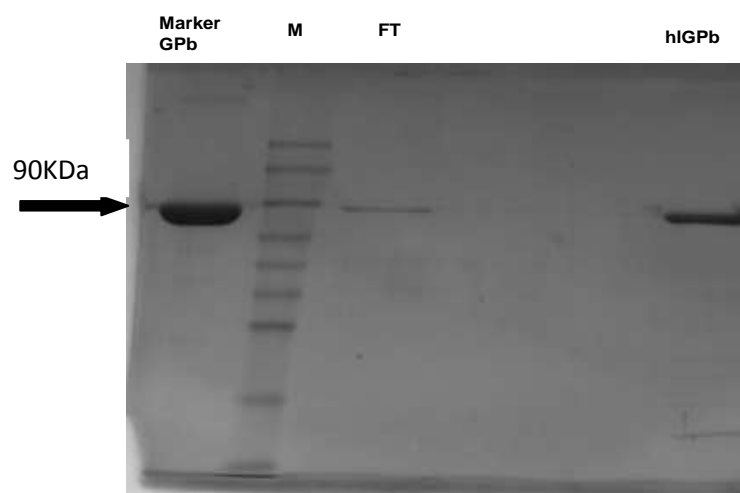
Η hIGPb συνεχίζει να έχει την ετικέτα των 6 ιστιδινών και εμφανίζει ακόμα συγγένεια με τα Ni^{+2} . Πραγματοποιείται πέψη με την πρωτεάση TEV ώστε να απομακρυνθεί η ετικέτα. Σε τελικό στάδιο πραγματοποιείται απομόνωση σε στήλη συγγένειας Ni^{+2} His-Trap, ώστε να απομακρυνθούν η ετικέτα 6 ιστιδινών και η πρωτεάση TEV. Στην εικόνα 4.25 φαίνεται το χρωματογράφημα της στήλης καθώς και η ανάλυση του δείγματος σε πηκτή

πολυακρυλαμίδιου 10%. Η hIGPb βρίσκεται καθαρή στα κλάσματα 1,2 και 3 (στο flow through).



Εικόνα 4.25: Ο σκοπός της στήλης ήταν ο καθαρισμός της hIGPb από την ετικέτα των ιστιδινών και από την πρωτεάση TEV. Ο καθαρισμός ήταν επιτυχής καθώς η hIGPb δεν προσδέθηκε στη στήλη και βρίσκεται στα κλάσματα 1,2 και 3, δηλαδή στο flow through. Ροζ γραμμή: η αρχή εισαγωγής του δείγματος, Πράσινη γραμμή: η συγκέντρωση άλατος. M: δείκτης μοριακών μαζών, Marker GPb: ειδικός δείκτης για την His-hIGPb, IN: το αρχικό δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη (In put), FT: ότι δεν κατάφερε να προσδεθεί στη στήλη (flow through), W: το κλάσμα εκπλύσης της στήλης (wash)

Ακολουθεί συμπύκνωση της πρωτεΐνης με φίλτρα με κατώφ 30.000, στους 4°C/4.000xg. Στην εικόνα 4.26 φαίνεται η συμπυκνωμένη πρωτεΐνη. Με τη μέθοδο Bradford (βλ. 3.1.8.14.) πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης και η τελική της συγκέντρωση ανέρχεται στα 0.2 mg/L. Η απόδοση του καθαρισμού και της απομόνωσης βελτιώθηκε κατά 4 φορές σε σχέση με παλαιότερες απομονώσεις (-50 μg/L) .

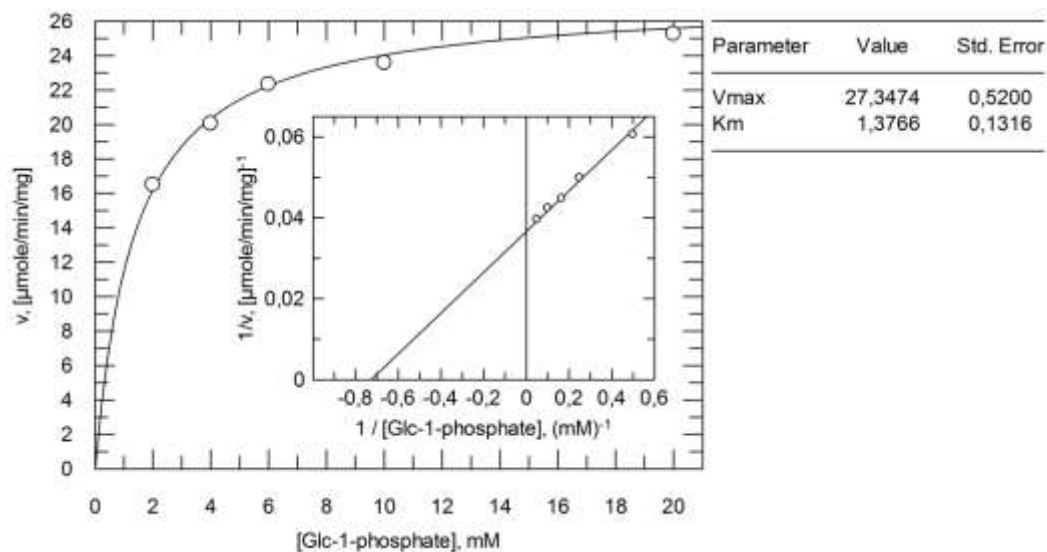


Εικόνα 4.26: Η hIGPb συμπυκνώθηκε σε τελικό όγκο 100μl και είναι καθαρή.

Παλαιότερη Απομόνωση	Απομόνωση με βελτιστοποιημένο γονίδιο & πρωτόκολλο
0.05 mg στο λίτρο	0.2 mg στο λίτρο

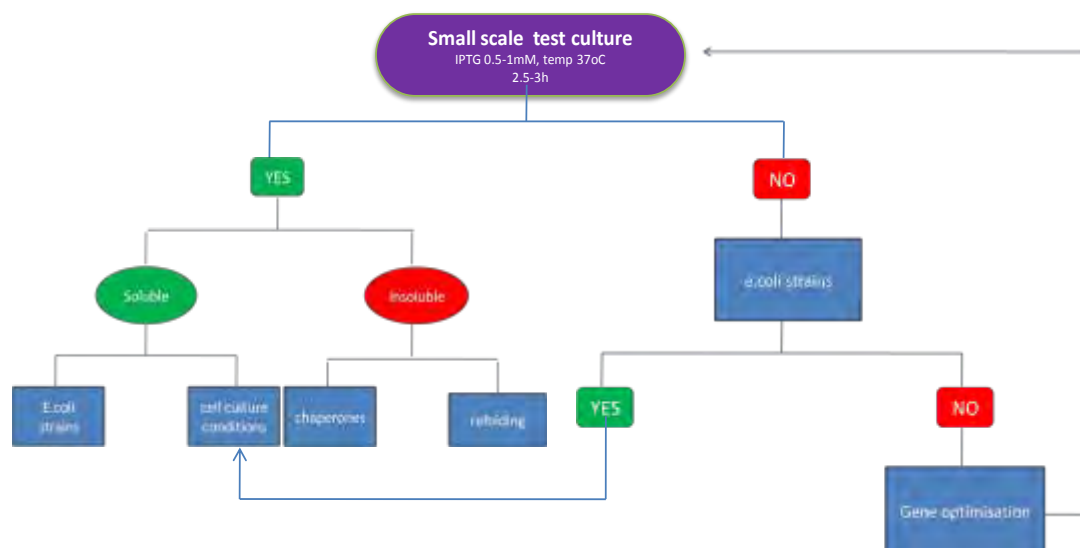
4.5. Κινητικές μελέτες hIGPb

Για να εξακριβωθεί η ενεργότητα της hIGP πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες (βλ. 3.2.12.) και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στο πρόγραμμα GraFit. Στην εικόνα 4.27 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών, V_{\max} και K_m . Η K_m προσδιορίστηκε ίση με 1.4 mM.



Η γενικότερη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση έκφρασης της hIGPb σε σύστημα έκφρασης E. coli συνοψίζεται στην παρακάτω εικόνα.

Μεθοδολογία βελτιστοποίησης έκφρασης πρωτεϊνών σε E.coli



5. Συζήτηση

Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου έχει μοριακό βάρος 97.5 KDa και καταλύει την διάσπαση του γλυκογόνου σε 1-φωσφορική γλυκόζη, η οποία στη συνέχεια εισέρχεται στον κύκλο της γλυκόλυσης ώστε να καλύψει τις ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού[6]. Κατά την ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης σε σύστημα *E. coli* παρουσιάστηκαν αρκετά προβλήματα. Το μεγάλο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης δεν ευνοεί τον κατάλληλο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών και την σωστή αναδίπλωση κατά την ετερόλογη έκφραση, με αποτέλεσμα να υπάρχει μειωμένη έκφραση ή η πρωτεΐνη να εκφράζεται υπό την μορφή έγκλειστων σωμάτων[12]. Σημαντικό πρόβλημα κατά την ετερόλογη έκφραση αποτέλεσε και η υψηλή συχνότητα εμφάνισης σπάνιων κωδικονίων στο γονίδιο της *hIGPb*, καθώς η *E. coli* αδυνατεί να διαβάσει κάποιες συγκεκριμένες τριπλέτες κωδικονίων[13].

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε μικρής κλίμακας καλλιέργειες, με την προσθήκη επαγωγέα, αλλά η *hIGPb* δεν εκφραζόταν σε υψηλά επίπεδα. Δοκιμάστηκαν πέντε διαφορετικές κυτταρικές σειρές (BL 21 Gold, B834, B834plysS, Origami, Rosetta2) στην προσπάθεια να βελτιωθεί η εικόνα της έκφρασης. Η έκφραση βελτιώθηκε σε μικρό βαθμό, αλλά η πρωτεΐνη δημιουργούσε έγκλειστα σωμάτια και εκφραζόταν με την αδιάλυτη μορφή της. Έγιναν προσπάθειες συνέκφρασης της *hIGPb* με *chaperones* ώστε να βελτιωθεί η διαλυτότητα και η έκφραση, αλλά και πάλι δεν πήραμε το επιθυμητό αποτέλεσμα[40]. Μελετήθηκαν διάφορες συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας (θρεπτικά μέσα, συγκεντρώσεις συμπαραγόντα) και διάφορες συνθήκες επαγωγής (συγκέντρωση IPTG, θερμοκρασία επαγωγής), με σκοπό να αυξηθεί η έκφραση και η διαλυτότητα, χωρίς όμως να αποδώσουν.

Εφ' όσον, όλες οι απόπειρες βελτίωσης της έκφρασης δεν έδωσαν το επιθυμητό αποτέλεσμα, αναλύθηκε το γονίδιο της *hIGP* (*PYGL*) με ειδικούς αλγόριθμους από τις εταιρίες Genescript και Eurofins. Οι αλγόριθμοι αυτοί αναλύουν πολλές παραμέτρους που αφορούν το ποσοστό εμφάνισης σπάνιων κωδικονίων, το ποσοστό GC, κ.α. στο γονίδιο της πρωτεΐνης στόχου. Σύμφωνα με τον αλγόριθμο OptimumGeneTM της Genescript, το πλαίσιο προσαρμογής κωδικονίων (CAI) στο γονίδιο της *hIGPb* ήταν 0.43, ενώ μετά από την βελτιστοποίηση του φτάνει το 0.96. Κατά συνέπεια ζητήθηκε από την εταιρία Eurofins να τροποποιηθούν όλα τα αρνητικά μοτίβα στο γονίδιο της *hIGPb* και να συντεθεί ένα νέο βελτιστοποιημένο γονίδιο (optimized gene), καταλληλότερο για την έκφραση στο σύστημα της *E. coli*. Το βελτιστοποιημένο γονίδιο, κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα *pET-M11*.

Μετά την βελτιστοποίηση του γονιδίου, τα επίπεδα της έκφρασης ήταν σε ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα, η *hIGPb* εκφραζόταν όμως και πάλι στην αδιάλυτη μορφή της. Ακολουθήθηκε η ίδια μεθοδολογία, όπως και στο μη βελτιστοποιημένο γονίδιο. Διαφορετικές κυτταρικές σειρές, συνέκφραση με *chaperones*, διαφορετικές συνθήκες

επαγωγής και δοκιμές συνθηκών για την αύξηση της διαλυτότητας. Το αποτέλεσμα ήταν η *hIGPb* να υπερεκφραστεί διαλυτή και η απόδοση του καθαρισμού και της απομόνωσης της να τετραπλασιαστεί σε σύγκριση με παλαιότερες απομονώσεις.

Η προτεινόμενη μεθοδολογία αφορά κάθε πρωτεΐνη της οποίας η ετερόλογη έκφραση στο βακτηριακό σύστημα της *E.coli* εμφανίζει προβλήματα. Σαν γενικό συμπέρασμα, καταλαβαίνουμε πως όταν όλες οι τροποποιήσεις που στοχεύουν στην αύξησης της έκφρασης μιας πρωτεΐνης δεν αποδίδουν, τότε η λύση είναι η βελτιστοποίηση του γονιδίου, απαλοίφοντας τα αρνητικά μοτίβα και διευκολύνοντας το σύστημα να εκφράσει την πρωτεΐνη στόχο.

6. Βιβλιογραφία

- [1],[3] S.E. Bondos & A. Bicknell, Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification, *Anal. Biochem.* 316 (2003) 223–231.
- [2] M. Garcia, M. Monge, G. Leon, S. Lizano, E. Segura, G. Solano, G. Rojas, J.M. Gutierrez, Effect of preservatives on IgG aggregation, complement-activating effect and hypotensive activity of horse polyvalent antivenom used in snakebite envenomation, *Biologicals* 30 (2002) 143–151.
- [4] T. San-Miguel, P. Pérez-Bermúdez, I. Gavidia, Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature, *SpringerPlus* 2013, 2:89.
- [5] Georgiou G. & Valax P., Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*, *Curr Opin Biotechnol.* 1996 Apr;7(2):190-7.
- [6],[47] V. L. Rath, M. Ammirati, P. K. LeMotte, K. F. Fennell, M. N. Mansour, D. E. Danley, T. R. Hynes, G. K. Schulte, D. J. Wasilko, J. Pandit, Activation of Human Liver Glycogen Phosphorylase by Alteration of the Secondary Structure and Packing of the Catalytic Core, *Molecular Cell*, Vol. 6, 139–148, July, 2000.
- [7] Skamnaki V.T., Kantsadi A.L., Chatzileontiadou D.S.M., Stravodimos G., Leonidas D.D. Glycogen metabolism enzymes as molecular targets for drug developments. 2013 by Nova Science Publishers, Inc.
- [8] M. OTTER-NILSSON & T. NILSSON, Protein expression a practical approach, chapter: Protein expression in mammalian cells, B.D. Hames & S. J. Higgins, ed., Oxford University Press, 1999, 304 pp.
- [9], [10], [11], [13] E. R. Appelbaum & A. R. Shatzman, Protein expression a practical approach, chapter: Prokaryotic in vivo expression systems, B.D. Hames & S. J. Higgins, ed., Oxford University Press, 1999, 304 pp.
- [12] S. M. Singh & A. K. Panda, Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 99, Issue 4, April 2005, Pages 303–310.
- [14], [15] S. Zhanga, G. Zubaya, E. Goldman, Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates, *Gene* Volume 105, Issue 1, 30 August 1991, Pages 61–72.
- [16] https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/optimisation_expression_levels/index.html
- [17] Papaneophytou C.P. & Kontopidis G., Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: a general review, *Protein Expr Purif.* 2014 Feb;94:22-32.
- [18] Oberg K., Chrnyk B.A., Wetzel R., Fink A.L., Native-like secondary structure in interleukin-1 β inclusion bodies by attenuated total reflectance FTIR, *Biochemistry.* 1994; 33:2628-2634
- [19] N. C. Price & L. Stevens, Fundamentals of Enzymology, Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins.
- [20] Fink A.L. Protein aggregation: Folding aggregates, inclusion bodies and amyloid, *Folding and Design*, 1998; 3:R9–R23

- [21], [22]NEB molecular cloning overview/technical guide
- [23] P. J. Russel, iGenetics: A molecular Approach.
- [24]Russell D. W., Sambrook J., (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
- [25]Addgene's Molecular Biology Plasmid Reference.
- [26]EMBL,https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/choice_vector/ecoli/embl/popup_emblvectors/
- [27]ThermoFischer
- [28]Bell C.E. & Lewis M., A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator, *Nature structural biology* 7, 209-14 (2000)
- [29]Baraniak P. R., Nelson D. M., Leeson C. E., Katakam A. K., Friz J. L., Cress D. E., Hong Y., Guan J., Wagner W. R., (2011). Spatial control of gene expression within a scaffold by localized inducer release, *Biomaterials* 32 (11): 3062–71.
- [30]Slonczewski J. & J. Watkins, Foster. *Microbiology: An Evolving Science*. New York: W.W. Norton & Co., 2009. Print
- [31] Daber R., Staybrook S., Rosenberg A. & Lewis M. Structural analysis of lac repressor bound to allosteric effectors. *Journal of molecular biology* 370, 609-19 (2007)
- [32]Telliott at English Wikipedia
- [33]<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/cell-culture/primary-cell-culture/primary-cell-culture-resources/frequently-asked-questions.html>
- [34]https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/optimisation_expression_levels/index.html
- [35]A. C. Looman, J. Bodlaender, L. J. Comstock, D. Eaton, P. Jhurani, H. A. de Boer & P. H. van Knippenberg, (1987) Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified lacZ gene in *Escherichia coli*.
- [36]https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/optimisation_expression_levels/index.html
- [37]Beissinger M. & Buchner J. (1998) How chaperones fold proteins.
- [38]Thomas J.G., Ayling A., Baneyx F., (1997) Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold.
- [39]Thomas J.G., Ayling A., Baneyx F., (1997) Molecular Chaperones, Folding Catalysts, and the Recovery of Active Recombinant Proteins from *E. coli*. *Appl. Biochem. Biotech* 66:197-238
- [40]Takara Bio Incorporation
- [41]Hudson et al., 1993a, 1993b;
- [42] Newgard C.B., Hwang P.K. & Fletterick R.J., (1989). The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 24, 69–99.
- [43]E. G. Krebs, E. H. Fischer, The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle.
- [44]Tengfei Zhang, Shiwen Wang, Yan Lin, Wei Xu, Dan Ye, YueXiong, Shimin Zhao, Kun-Liang Guan. (2012) Acetylation Negatively Regulates Glycogen Phosphorylase by Recruiting Protein Phosphatase
- [45]Johnson L.N., (1992) Glycogen phosphorylase: Control by phosphorylation and allosteric effectors.

- [46], L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymoczko, Biochemistry
- [48]LoranneAgius, (2015) Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism.
- [49] Graves, D. J. and Wang, J. H., α -Glucanphosphorylases - chemical and physical basis of catalysis and regulation, *Enzymes*, 7, 435, 1972
- [50]Madsen N. B. and Withers S. G., Glycogen phosphorylase, in *Coenzymes and Cofactors: Vitamin 86 Catalysis*, Dolphin, D., Poulson. R., and Avramovic, O., Eds., John Wiley & Sons, New York, 1986, 355
- [51]Kastenschmidt L. L., Kastenschmidt J., &Helmreich E. H., Subunit interactions and their relationship to the allosteric properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase b. *Biochemistry*, 7, 3590, 1968
- [52]Kobayashi M., Soman G., Graves D.J. A comparison of the activator sites of liver and muscle glycogen phosphorylase b.
- [53]D.S. Bali, J.L. Goldstein, K. Fredrickson, et al., Variability of disease spectrum in childrenwith liver phosphorylase kinase deficiency caused by mutations in the PHKG2gene, *Mol. Genet. Metab.* 111 (3) (2014) 309–313.
- [54]N.J. Beauchamp, A. Dalton, U. Ramaswami, et al., Glycogen storage disease type IX:high variability in clinical phenotype, *Mol. Genet. Metab.* 92 (1–2) (2007) 88–99
- [55]Guoqiang Jiang, Bei B. Zhang, Glucagon and regulation of glucose metabolism, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* Published 1 April 2003 Vol. 284 no. 4, E671-E678.
- [56]Abraira C., Colwell J.A., Nuttall F.Q., Sawin C.T., Nagel N.J., Comstock J.P., Emanuele N.V., Levin S.R., Henderson W., Lee H.S. 1995 Veterans Affairs Cooperative Study on glycemic control and complications in type II diabetes (VA CSDM). Results of the feasibility trial. *Veterans Affairs Cooperative Study in Type II Diabetes*.
- [57]M. M. Adeva-Andany, M. González-Lucán, C.Donapetry-García, C.Fernández-Fernández, E.Ameneiros-Rodríguez, Glycogen metabolism in humans, *BBA Clinical* 5 (2016) 85–100.
- [58]C.B. Newgard, R.J. Fletterick, L.A. Anderson, R.V. Lebo, The polymorphic locus for glycogen storage disease VI (liver glycogen phosphorylase) maps to chromosome 14, *Am. J. Hum. Genet.* 40 (4) (1987) 351–364.
- [59] Phillips TA, VanBogelen RA, Neidhardt FC. Ion gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *Journal of bacteriology* 1984;159:283-7.
- [60] Novagen. Competent cells.
- [61] Leahy, D. J., Hendrickson, W. A., Aukhil, I., and Erickson, H. P. (1992) *Science* 258, 987–991.
- [62]Green C.B., Besharse J.C., Identification of a novel vertebrate circadian clock-regulated gene encoding the protein nocturnin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:14884-8.
- [63]Weber K., Osborn M., The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of biological chemistry* 1969;244:4406-12.
- [64]Aich P., Patra M., Chatterjee A.K., Roy S.S., Basu T., Calcium chloride made *E. coli* competent for uptake of extraneous DNA through overproduction of OmpC protein. *The protein journal* 2012;31:366-73.
- [65]Bukau B. B.J., Boos W. Ca²⁺-induced permeabilization of the *Escherichia coli* outer membrane: comparison of transformation and reconstitution of binding-protein-dependent transport. *Journal of bacteriology* 1985;163.
- [66]Egger L.A., Park H., Inouye M., Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 1997;2:167-84.

- [67] Shigekawa K. & Dower W.J. *Biotechniques*. 1988 Sep;6(8):742-51. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells.
- [68] Macherey Nagel.
- [69] Genetics N. Midori Green advanced DNA stain
- [70] John M, Clark, J.R., Switzer, R.L. Ηλεκτροφόρηση. Πειραματική Βιοχημεία: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης; 1991. p. 45.
- [71] Bornhorst J.A., Falke J.J., Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in enzymology* 2000;326:245-54
- [72] Porath J., Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein expression and purification* 1992;3:263-81
- [73] Waugh DS. Making the most of affinity tags. *Trends in biotechnology* 2005;23:316-20
- [74] Waugh DS. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein expression and purification* 2011;80:283-93.
- [75] Phan, J., Zdanov, A., Evdokimov, A. G., Tropea, J. E., Peters, H. P. K., Kapust, R. B., Li, M., Wlodawer, A., and Waugh, D. S. (2002). Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease. *J. Biol. Chem.* 277: 50564-50572.
- [76] GE Healthcare. Ion Exchange Chromatography Principles and Methods
- [77] Tsirkone VG, Tsoukala E, Lamprakis C, Manta S, Hayes JM, Skamnaki VT, et al. 1-(3-Deoxy-3-fluoro-beta-d-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies. *Bioorg Med Chem* 2010;18:3413-25.
- [78] Saheki S, Takeda A, Shimazu T. Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Anal Biochem* 1985;148:277-81.
- [79] Genescript.
- [80] Kyriakis, E., Kantsadi, L.A., Stravodimos, A.G., Chatzileontiadou, S.M.D., Leonidas, D.D., Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b. (2015) *Febs Lett.* 589: 1787-1794
- [81] Kantsadi, A.L., Apostolou, A., Theofanous, S., Stravodimos, G.A., Kyriakis, E., Gorgogietas, V.A., Chatzileontiadou, D.S., Pegiou, K., Skamnaki, V.T., Stagos, D., Kouretas, D., Psarra, A.M., Haroutounian, S.A., Leonidas, D.D., Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. (2014) *Food Chem.Toxicol.* 67: 35-43

Παράρτημα 1

Sequence codon-usage adapted for E.coli:

Starting sequence:

5'-ATGGCGAAGCCCCTGACGGACCAGGAGAAGCGGCGGCAGATCAGCATCCGCGGCATCGTG
GGCGTGAGAACGTGGCAGAGCTGAAGAAGAGTTTCAACCGGCACCTGCACTTCACGCTG
GTCAAGGACCGCAACGTGGCCACCACCCGCGACTACTACTTCGCGCTGGCGCACACGGTG
CGCGACCACCTGGTGGGGCGCTGGATCCGCACGCAGCAGCACTACTACGACAAGTGCCCC
AAGAGGGTATATTACCTCTCTCTGGAATTTTACATGGGCCGAACATTACAGAACACCATG
ATCAACCTCGGTCTGCAAAATGCCTGTGATGAGGCCATTTACCAGCTTGGATTGGATATA
GAAGAGTTAGAAGAAATTGAAGAAGATGCTGGACTTGGCAATGGTGGTCTTGGGAGACTT
GCTGCCTGCTTCTTGGATTCCATGGCAACCCTGGGACTTGCAGCCTATGGATACGGCATT
CGGTATGAATATGGGATTTTCAATCAGAAGATCCGAGATGGATGGCAGGTAGAAGAAGCA
GATGATTGGCTCAGATATGGAAACCCTTGGGAGAAGTCCCGCCAGAAATTCATGCTGCCT
GTGCACTTCTATGAAAAAGTAGAACACACCAACACCGGGACCAAGTGGATTGACACTCAA
GTGGTCCTGGCTCTGCCATATGACACCCCCGTGCCGGCTACATGAATAAACTGTCAAC
ACCATGCGCCTCTGGTCTGCTCGGGCACCAAATGACTTTAACCTCAGAGACTTTAATGTT
GGAGACTACATTCAGGCTGTGCTGGACCGAAACCTGGCCGAGAACATCTCCCGGGTCTCT
TATCCCAATGACAATTTTTTTGAAGGGAAGGAGCTAAGATTGAAGCAGGAATACTTTGTG
GTGGCTGCAACCTTGCAAGATATCATCCGCCGTTTCAAAGCCTCCAAGTTTGGCTCCACC
CGTGGTGAGGAAGTGTGTTTGATGCCTTCCCGGATCAGGTGGCCATCCAGCTGAATGAC
ACTCACCTGCACTCGCGATCCCTGAGCTGATGAGGATTTTTGTGGATATTGAAAACTG
CCCTGGTCCAAGGCATGGGAGCTACCCAGAAGACCTTCGCCTACACCAACCACACAGTG
CTCCCGGAAGCCCTGGAGCGCTGGCCCGTGGACCTGGTGGAGAAGCTGCTCCCTCGACAT
TTGGAAATCATTTATGAGATAAATCAGAAGCATTTAGATAGAATTGTGGCCTTGTTTCCT
AAAGATGTGGACCGTCTGAGAAGGATGTCTCTGATAGAAGAGGAAGGAAGCAAAAGGATC
AACATGGCCCATCTCTGCATTGTGCGTTCCCATGCTGTGAATGGCGTGGCTAAAATCCAC

TCAGACATCGTGAAGACTAAAGTATTCAAGGACTTCAGTGAGCTAGAACCTGACAAGTTT
 CAGAATAAAACCAATGGGATCACTCCAAGGCGCTGGCTCCTACTCTGCAACCCAGGACTT
 GCAGAGCTCATAGCAGAGAAAAATTGGAGAAGACTATGTGAAAGACCTGAGCCAGCTGACG
 AAGCTCCACAGCTTCTGGGTGATGATGTCTTCTCCGGGAACCTGCCAAGGTGAAGCAG
 GAGAATAAGCTGAAGTTTTCTCAGTTCTGGAGACGGAGTACAAAGTGAAGATCAACCCA
 TCCTCCATGTTTGATGTCCAGGTGAAGAGGATACATGAGTACAAGCGACAGCTCTTGAAC
 TGTCTGCATGTGATCACGATGTACAACCGCATTAAAGAAAGACCCTAAGAAGTTATTCGTG
 CCAAGGACAGTTATCATTGGTGGTAAAGCTGCCCCAGGATATCACATGGCCAAAATGATC
 ATAAAGCTGATCACTTCAGTGGCAGATGTGGTGAACAATGACCCTATGGTTGGAAGCAAG
 TTGAAAGTCATCTTCTGGAGAACTACAGAGTATCTCTTGCTGAAAAAGTCATTCCAGCC
 ACAGATCTGTCAGAGCAGATTTCCACTGCAGGCACCGAAGCCTCGGGGACAGGCAATATG
 AAGTTCATGCTAAATGGGGCCCTAACTATCGGGACCATGGATGGGGCCAATGTGGAAATG
 GCAGAAGAAGCTGGGGAAGAGAACCTGTTTCATCTTTGGCATGAGGATAGATGATGTGGCT
 GCTTTGGACAAGAAAGGGTACGAGGCAAAAGAATACTATGAGGCACTTCAGAGCTGAAG
 CTGGTCATTGATCAAATTGACAATGGCTTTTTTTCTCCAAGCAGCCTGACCTCTTCAA
 GATATCATCAACATGCTATTTTATCATGACAGGTTTAAAGTCTTTCAGACTACGAAGCC
 TATGTCAAGTGTCAAGATAAAGTGAGTCAGCTGTACATGAATCCAAAGGCCTGGAACACA
 ATGGTACTCAAAAACATAGCTGCCTCGGGGAAATTCTCCAGTGACCGAACAATTAAAGAA
 TATGCCCAAAACATCTGGAACGTGGAACCTTCAGATCTAAAGATTTCTCTATCCAATGAA
 TCTAACAAAGTCAATGGAAATTAG-3'

Adapted sequence:

5'-

ATGGCGAAACCGCTCACCGATCAGGAGAAACGTCGCCAAATCTCCATTCGCGGTATTGTGGGTGTGGAAAACG
 TAGCGGAGTTAAAGAAATCCTTTAACCGTCATCTCCACTTTACGCTGGTGAAAGATCGCAACGTCGCGACAACG
 CGCGACTACTACTTTGCTCTTGCGCATACCGTCCGCGATCATTTAGTAGGTCGTTGGATTTCGCACTCAACAGCAT
 TACTATGACAAATGCCAAAACGGGTGTATTACTTGTGCTGGAGTTTTACATGGGTGCGACCCTTCAGAACAC
 GATGATCAATCTGGGCCTCCAAAACGCGTGTGATGAAGCCATTTATCAGTTAGGGTTGGACATTGAAGAGCTG

GAAGAAATCGAAGAAGATGCCGGCTTGGGTAATGGCGGATTAGGACGTTTAGCAGCCTGCTTTCTCGATTCTGA
TGGCAACCCTCGGTTTAGCTGCATATGGCTACGGCATCCGTTATGAATATGGCATCTTTAACCAGAAAATCCGT
GATGGTTGGCAAGTTGAAGAAGCGGACGATTGGTTACGCTATGGTAATCCGTGGGAGAAATCTCGTCCCGAAT
TTATGCTTCCCGTACACTTTTATGGCAAAGTGGAACACACCAACACCGGGACCAAGTGGATCGACACTCAGGTC
GTCCTTGCAATTGCCGTATGATACGCCTGTACCGGGTTACATGAACAACACTGTCAATACCATGCGCCTGTGGTCA
GCGCGGGCACCAAACGACTTTAACTTGCCTGACTTCAACGTTGGCGATTACATTCAGGCAGTGCTTGATCGCAA
CCTTGCAAGAAATATTTCTCGTGTGTTGTATCCTAACGACAATTTCTCGAGGGGAAAGAACTCCGCTTGAAGC
AGGAATACTTTGTCGTCGCTGCAACCCTTCAAGACATTATCCGGCGCTTCAAAGCGTCGAAGTTCCGGCAGCACA
CGCGGTGCAGGCACTGTCTTGATGCCTTTCCCGATCAAGTGGCGATCCAGCTCAATGATACGCATCCAGCCCT
GGCAATTCCTGAGCTGATGCGTATCTTTGTGGACATTGAGAACTTCCGTGGTCAAAAAGCCTGGGAATTAACCC
AGAAAACGTTTGCCTATACCAATCATACAGTGTGCTGAGGCTTTAGAACGTTGGCCTGTGGATCTGGTAGAG
AAACTCTTGCCACGCCATCTCGAAATTATTTACGAAATCAATCAGAAACATCTGGACCGGATTGTAGCGCTGTT
CCGAAAGACGTTGATCGTTTACGCCGTATGAGTTTGATCGAAGAGGAAGGCAGTAAACGCATCAACATGGCCC
ATTTGTGCAATTGTGGGTAGTCATGCTGTAAACGGCGTCGCGAAAATTAAGTCCGACATTGTGAAAATAAGGTA
TTCAAAGATTTTAGCGAACTGGAACCCGACAAATTCAGAACAAAACAAATGGAATCACCCACGTCGCTGGCT
GTTACTGTGTAATCCGGGCCTGGCCGAGCTGATTGCGGAGAAGATCGGTGAAGATTACGTTAAAGACCTGTCT
CAGCTGACCAAACACTGCACTCATTCTGGGCGATGATGTGTTTCTGCGCGAACTGGCCAAAGTGAAACAGGAAA
ACAAACTGAAATTCAGTCAGTTCCTGGAACGGAATACAAAGTGAAAATTAACCCGAGCTCTATGTTTGATGTT
CAGGTGAAACGCATTACGAATATAAGCGTCAGCTGCTGAATTGTCTGCACGTGATCACCATGTATAACCGCAT
CAAAAAAGATCCGAAGAACTGTTCTGTTCCGCGTACCGTGATTATTGGTGGTAAAGCGGCACCGGGCTACCAT
ATGGCTAAAATGATCATTAAAGCTGATTACCAGCGTGGCTGATGTAGTTAATAACGATCCAATGGTTGGTAGCAA
ACTGAAAGTCATCTTCCTGGAGAATTATCGCGTTTCTCTGGCCGAGAAGGTAATTCGGCTACGGACCTGTCGG
AACAAATTAGCACTGCGGGGACAGAAGCATCAGGGACCGGGAACATGAAGTTTATGCTGAATGGCGCGCTGA
CTATTGGCACGATGGATGGCGCCAATGTTGAAATGGCGGAGGAAGCGGGTGAAGAAAACCTGTTTATTTTCGG
AATGCGTATCGACGATGTTGCGGCACTGGATAAGAAAGGGTATGAAGCCAAAGAATATTATGAGGCGCTGCCG
GAACTGAACTGGTTATTGACCAAATCGATAACGGCTTCTTTCCCCGAAACAGCCGGATCTGTTTAAAGACATC
ATTAACATGCTGTTCTATCACGATCGCTTTAAAGTTTTCGCGGATTACGAAGCCTATGTGAAATGCCAAGACAAA
GTTTCGCAACTGTACATGAATCCGAAGGCGTGGAACACGATGGTGCTGAAAAACATTGCCGCTTCCGGCAAATT
CAGCAGTGATCGCACGATCAAGGAATATGCCAGAATATTTGGAATGTCGAACCGAGCGATCTGAAGATTTG
CTGAGCAATGAAAGCAATAAAGTCAATGGAACTAA-3'

Codon Usage

(Format: <optimal frequency> | <current frequency>)

D(53)	E(59)	F(40)	G(48)	A(59)	C(7)
gat: 0.83 0.47	gaa: 0.69 0.54	tct: 0.57 0.48	ggt: 0.94 0.17	gct: 0.16 0.24	tgt: 0.44 0.43
gac: 0.37 0.53	gag: 0.31 0.46	ttc: 0.43 0.52	ggc: 0.40 0.25	gcc: 0.27 0.41	tgc: 0.56 0.57
			gga: 0.11 0.31	gca: 0.21 0.29	
			ggg: 0.15 0.27	gcg: 0.36 0.07	
T(1)	L(84)	M(23)	N(50)	H(19)	I(55)
taa: 0.71 0.00	tta: 0.13 0.05	atg: 1.00 1.00	aat: 0.45 0.46	cat: 0.57 0.37	att: 0.58 0.36
tag: 0.00 1.00	ttg: 0.13 0.12		aac: 0.55 0.54	cac: 0.43 0.63	atc: 0.42 0.49
tga: 0.29 0.00	ttt: 0.10 0.10				ata: 0.00 0.15
	ctc: 0.10 0.24				
	cta: 0.00 0.10				
	ctg: 0.53 0.40				
K(65)	T(40)	W(12)	V(58)	Q(29)	P(32)
aaa: 0.77 0.38	act: 0.17 0.22	tgg: 1.00 1.00	gtt: 0.26 0.05	caa: 0.35 0.21	cct: 0.16 0.34
aag: 0.23 0.62	acc: 0.44 0.42		gtc: 0.22 0.22	cag: 0.65 0.79	ccc: 0.12 0.25
	aca: 0.13 0.18		gta: 0.15 0.10		cce: 0.19 0.34
	acg: 0.27 0.18		gtg: 0.37 0.42		cpg: 0.53 0.06
S(35)	R(44)	Y(35)			
tcc: 0.15 0.23	cgt: 0.38 0.07	tat: 0.57 0.43			
tca: 0.15 0.34	cgc: 0.52 0.27	tac: 0.43 0.57			
tcc: 0.12 0.11	cga: 0.00 0.14				
tcg: 0.15 0.06	cgg: 0.10 0.16				
agt: 0.15 0.11	aga: 0.00 0.16				
sga: 0.25 0.14	agg: 0.00 0.20				

Bad Motifs

Motif(DNA)

GAAGAC
GTCTTC
GGTCTC
GAGACC
CGTCTC
GAGACG
AAAAA
TTTTT
AAAAAAA
TTTTTTT
CCCCC
GGGGG
GGGGG
CCCCC
TTTTT
AAAAA
GCAGGT
ACCTGC
AGGTRAG
CTYACCT
GGTCTCNNNNN
NNNNNGAGACC

Good Motifs

Motif(DNA&Protein)

Other Options

Plasmid Name:	pETm11-pETm11-Gene	Internal Name:	QR57-2-5ABC
Gene Name:	pETm11-Gene	Gene Size:	2555bp
Vector Backbone:	pETm11	Antibiotic Selection:	Kanamycin
Cloning:	NcoI/XhoI	Quantity:	4.7µg

Plasmid Map

Insert: pETm11-Gene

5' Restriction Site: NcoI

3' Restriction Site: XhoI

Cloning: NcoI/XhoI

